

**UNIVERZITA KARLOVA  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Lipoprotein asociovaná fosfolipáza A2 u diabetických pacientů ve stáří**

**Joao Fortunato**

**Autoreferát dizertační práce**

**Doktorský studijní program  
Vnitřní lékařství**

**Hradec Králové**

**2020**

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Vnitřní lékařství na Lékařské fakultě UK v Hradci Králové.

**Autor:** MUDr. Joao Fortunato  
III. interní gerontometabolická klinika, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

**Školitel:** prof. MUDr. Vladimír Blaha, CSc.  
III. interní gerontometabolická klinika, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

**Školitel konzultant:** prof. MUDr. Luboš Sobotka, CSc.  
III. interní gerontometabolická klinika, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

**Oponenti:** Prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D., Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova  
Prof. MUDr. Vladimír Soška, CSc., Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice U sv. Anny v Brně

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MH CR no. NT/12287-5 a PRVOUK P37/22

S dizertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc., FCMA  
Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací  
v doktorském studijním programu Vnitřní lékařství  
Garant studijního programu

# 1. Obsah

2. Souhrn.....	4
3. Summary .....	5
4. Úvod .....	6
4.1. Lp-PLA2 biochemie .....	6
4.2. Lp-PLA2 funkce .....	7
4.3. Lp-PLA2 a vazba na lipoproteiny .....	9
4.4. Lp-PLA2, pohlaví, věk a rasa .....	10
4.5. Lp-PLA2 a kardiovaskulární onemocnění .....	11
4.6. Lp-PLA2 a cévní mozková příhoda .....	11
4.7. Lp-PLA2 a rekurentní kardiovaskulární onemocnění .....	12
4.8. Lp-PLA2 a recidivující cévní mozkové příhody .....	12
4.9. Současný state of the art – metaanalýzy .....	12
4.10. Genomové variace .....	13
4.11. Lp-PLA2 inhibitory .....	13
5. Ateroskleróza .....	14
5.1. Tukové proužky .....	14
5.2. Formování pěnových buněk .....	15
5.3. Aterom .....	16
5.4. Utváření nekrotických jader .....	16
5.5. Angiogeneze .....	17
5.6. Fibróza a kalcifikace .....	17
5.7. Ruptura aterosklerotického plátu .....	18
6. Stenóza aortální chlopně a transkatetrová implantace aortální chlopně .....	20
7. Diabetická dyslipidemie .....	22
8. Cíle studie .....	23
9. Metody, statistické analýzy .....	24
10. Výsledky .....	26
11. Diskuze .....	31
12. Závěr .....	35
13. Reference .....	36
14. Publikace autorů .....	45

## 2. Souhrn

Lipoprotein asociovaná fosfolipáza A2 (Lp-PLA2) je extracelulární na  $\text{Ca}^{2+}$  nezávislý enzym velikosti 45 kDa tvořený celkem z 441 aminokyselin. Obíhá v krevní plazmě ve své aktivní formě a je zakódována na genu PL2G7 umístěném na chromozómu 6p12-21.1. Lp-PLA2 hydrolyzuje několik typů krátkých řetězců a oxidované fosfolipidy na druhé pozici glycerolového řetězce. Je většinou vázána na částice lipoproteinů s nízkou densitou (LDL) a věří se, že hraje podstatnou roli v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. Faktem je, že již řada studií navrhla, že zvýšená hmotnostní koncentrace a/nebo aktivita Lp-PLA2 je nezávislým rizikovým faktorem pro rozvoj či recidivu kardiovaskulárních chorob.

Provedli jsme průřezovou analýzu na 44 geriatrických pacientech s věkovým průměrem  $79.6 \pm 5.6$  let, kteří podstoupili transkatetrovou implantaci aortální chlopně (TAVI) či balonovou valvuloplastiku (BV) jako léčbu vážné stenózy aortální chlopně. U starších pacientů byla Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace zvýšena již před TAVI či BV a výrazně vzrostla po daných zákrocích. Zjistili jsme silnou provázanost mezi LDL koncentrací, celkovým cholesterolem a triglyceridy. Základní hodnota Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace byla zvýšena u diabetických pacientů v porovnání s nediabetickými. Poté jsme se věnovali srovnání zjištěných poznatků s dostupnou literaturou. Dále jsme zkoumali současné dostupné metaanalýzy a roli, jakou hraje možná korelační statistika, i přesto, že úloha studovaného enzymu není ještě zcela známa.

### 3. Summary

Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) is an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -independent 45 kDa secreted enzyme formed by 441 amino acids. It circulates in plasma in the active form and is encoded in the PLA2G7 gene located on chromosome 6p12-21.1. Lp-PLA2 hydrolyzes several types of short-chain and oxidized phospholipids that harbor acyl groups at the second position of the glycerol backbone. It is mostly bound to low density lipoprotein (LDL) particles and it is thought to play a role in the development of cardiovascular diseases (CVDs). Indeed, multiple studies propose that elevated mass concentration and/or activity of Lp-PLA2 is an independent risk factor for the development or recurrence of CVDs.

We performed a cross-sectional analysis on 44 geriatric patients aged  $79.6 \pm 5.6$  years that had undergone transcatheter aortic valve implantation (TAVI) or balloon valvuloplasty (BV) for the treatment of severe aortic stenosis. Lp-PLA2 mass concentration was already increased in elderly patients before TAVI or BV and significantly increased after the procedures. We found strong correlations with LDL concentration (LDL-C), total cholesterol and triglycerides. Baseline Lp-PLA2 mass concentration was increased in diabetic patients comparing to non-diabetic patients. We then discuss and explore these findings in comparison to the available literature. We also question the current available meta-analyses and the role of correlational statistics when the role of the studied enzyme is not completely understood.

## 4. Úvod

V dnešní společnosti je ateroskleróza obecně rozšířena a v rozvinutých zemích převyšují kardiovaskulární choroby jiné v počtu způsobených úmrtí. Mezi lékaři jsou jakékoli zásahy či opatření ve snaze zabránit či předejít a zvrátit další vývoj aterosklerózy, snížit riziko ruptury aterosklerotického plátu a ve své podstatě snížit incidenci kardiovaskulárních chorob, neskonale vítány.

Fosfolipázy A2 jsou rozmanitou třídou esteráz schopných rozpoznat a katalyzovat hydrolyzu *sn-2* esterových vazeb glycerofosfolipidů za vzniku neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA), jako je kyselina arachidonová, a lysofosfolipidů. Tato skupina enzymů se dále dělí na šest podskupin dle jejich struktury, katalytických mechanismů, umístění a evolučních vztahů. Tyto skupiny zahrnují enzymy 1) buněčné cytosolické  $Ca^{2+}$  nezávislé, 2) buněčné cytosolické  $Ca^{2+}$  závislé, 3) sekreční fosfolipázu A2 (sPLA2), 4) lysosomální fosfolipázu A2, 5) adipózní specifickou fosfolipázu A2 a 6) lipoprotein asociovanou fosfolipázu A2 (Lp-PLA2) (Ramanadham *et al.*, 2015). Většina jejich produktů funguje jako nebo tvoří signální molekuly kupříkladu prostaglandiny, leukotrieny a faktor aktivující destičky (PAF), které zasahují do hostitelské obrany, zánětu a vnitřní imunity (Stafforini, 2009).

Lp-PLA2 je také známa jako acetylhydroláza faktoru aktivujícího krevní destičky (PAF-AH) díky tomu, že byla objevena kvůli své schopnosti katalyzovat hydrolyzu PAF; nebo také jako fosfolipáza A2 skupiny 7 (PLA2G7, kvůli genu ve kterém je zakódována). Uvažuje se také o její značné fyziologické a patofyziologické roli aktivního účastníka a prostředníka ve stavech oxidačního stresu, zánětu a rozvoji aterosklerotického plaku.

### 4.1. Lp-PLA2 biochemie

Lp-PLA2 je extracelulární  $Ca^{2+}$  nezávislý enzym velikosti 45kDa skládající se ze 441 aminokyselin, které se pohybují v plazmě ve své aktivní formě. Je zakódována v PLA2G7 genu na chromozomu 6p12-21.1. Má vazebná místa pro nízko- a vysokodenzitní lipoproteiny (LDL, HDL). Hematopoetické kmenové buňky jako například monocyty, makrofágy, žírné buňky a T-lymfocyty, jsou hlavními zdroji Lp-PLA2.

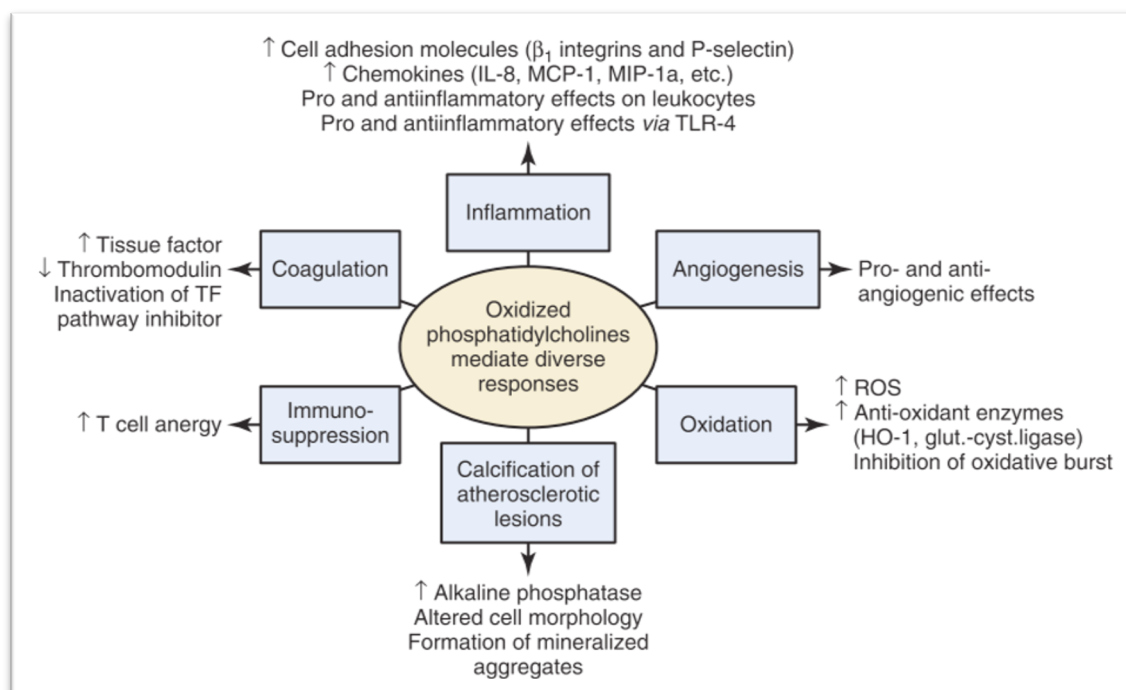
## 4.2. Lp-PLA2 funkce

Lp-PLA2 hydrolyzuje několik druhů krátkých řetězců (až do pětiuhlíkaté délky) a oxiduje fosfolipidy na druhé pozici glycerolového řetězce. Díky této unikátní látkové specifitě může enzym volně cirkulovat v plazmě, aniž by byla hydrolyzována buněčná stěna, která se skládá právě z fosfolipidů. Oxidované fosfolipidy jsou považovány za induktory makrofágové chemotaxe a přispívají k zahájení a progresi chronického zánětlivého stavu, který je typický pro aterosklerózu. Spekuluje se nad možnou ochrannou funkcí Lp-PLA2, protože je schopná hydrolyzovat tyto bioaktivní, prozánětlivé, oxidativně rozštěpené fosfolipidy vzniklých během oxidace LDL.

Na druhé straně, jak s pokračujícím průběhem onemocnění roste množství oxidovaných fosfolipidů, zvyšují se i projevy prozánětlivé, hemokoagulační a proaterogenní. Reakce katalyzovaná enzymem Lp-PLA2 dává vzniknout lysofosfatidylcholinu, oxidovaným NEFA a krátkým NEFA, tedy molekul, které se ukázali býti vysoce efektivními mediátory proaterogenního zánětu.

Lysofosfatidylcholin, cestou jeho efektu na receptoru spřaženým s G proteinem G2A, moduluje endoteliální aktivaci, potlačuje vznik oxidu dusnatého, inhibuje migraci a proliferaci buněk, a inhibuje fagocytární clearance apoptických buněk (Mallat, Lambeau and Tedgui, 2010). Tyto projevy mohou přispívat k iniciaci a další progresi aterosklerózy. Plasmatická koncentrace lysofosfatidylcholinu se u zdravého jedince obvykle pohybuje mezi 200 až 400  $\mu\text{mol/l}$ . Schéma 1 zobrazuje patofyziologické projevy oxidovaného lysofosfatidylcholinu. Ve zkratce, Lp-PLA2 se zdá býti základním činitelem rozvoje a progresu zánětu, především kvůli svým prozánětlivým produktům, lysofosfatidylcholinu a oxidovaným NEFA.

Oxidované NEFA s krátkými řetězci se mohou chovat jako endogenní ligandi jaderných receptorů, které inhibují prozánětlivou genovou expresi a podněcují diferenciaci monocytů tak, aby se z nich staly monocyty protizánětlivé (M2) (Litvinov *et al.*, 2010). Stručně řečeno, substráty a produkty Lp-PLA2 prokázaly jak prozánětlivé, tak i protizánětlivé a prooxidační i antioxidační účinky.



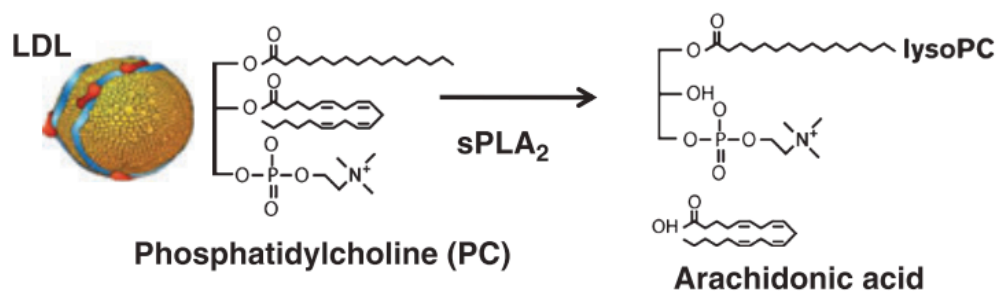
**Schéma 1 – Patofyziologické účinky oxidovaného fosfatidylcholinu**

IL – interleukin, MCP-1 = mono MCP-1 = monocyte-chemoattractant protein-1, MIP-1a = macrophage inflammatory protein-1a, ROS = reactive oxygen species, TF = tissue factor (Clinical Lipidology, a Companion to Braunwald's Heart Disease, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier Saunders, Christie M. Ballantyne, M.D., 2015)

Sekreční fosfolipáza A2 (sPLA2) vyžaduje pro řádné fungování vysokou koncentraci kalcia a hydrolyzuje širokou škálu fosfolipidových substrátů podle typu enzymové isoformy. Tak jako Lp-PLA2, sPLA2 má možná v arteriální stěně proaterogenní vlastnosti. (Webb, 2005).

Hydrolyza fosfolipidů sPLA2 vede ke vzniku potenciálně bioaktivních lipidů, včetně neesterifikovaných mastných kyselin (zejména kyselině arachidonové) a lysofosfolipidům (Schéma 2). Nutno poznamenat, že na rozdíl od Lp-PLA2, sPLA2 hydrolyzuje neoxidované fosfolipidy obsažené v neoxidovaných LDL částicích.





### Schéma 2 – účinek sekreční fosfolipázy A2 (sPLA2)

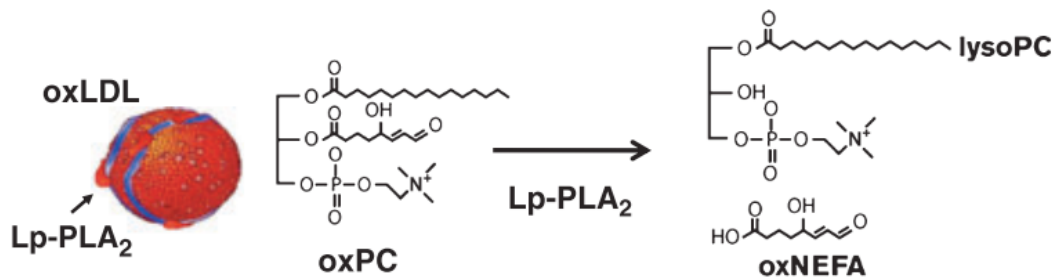
lysoPC = lysophosphatidylcholine (Macphee, Nelson and Zalewski, 2006)

#### 4.3. Lp-PLA2 a vazba na lipoproteiny

U člověka platí, že 70-80 % cirkulující Lp-PLA2 je nekovalentně vázáno na LDL, 15-20 % je obsaženo v HDL a zbytek se hromadí v lipoproteinu s velmi nízkou denzitou (VLDL). Má větší afinitu k nejmenším, nejhustším a nejvíce elektronegativním LDL, a to nejspíše z důvodu, že se v těchto částicích mění konformace apoB100 (která je jiná než u větších LDL) a usnadňuje spojení s Lp-PLA2 (Stafforini et al., 1999). Avšak pouze malý zlomek z cirkulujících částic LDL má k sobě připojeno Lp-PLA2 (zhruba 1 %). Což znamená, že většina LDL částic tento enzym vůbec neobsahuje. Umístění vazby molekuly Lp-PLA2 se odlišuje podle toho, zda nosný lipoprotein je LDL nebo HDL. Lp-PLA2 vázaná na HDL má mnohem nižší specifickou aktivitu než vázaná na LDL. Poměr LDL vůči HDL (LDL/HDL) může záviset na míře jejich glykosylace. Poměr Lp-PLA2 vázané na LDL a HDL se také liší druh od druhu. Kupříkladu Lp-PLA2 se u morčat, krys a myší váže výhradně na HDL částice, což se významně odráží v roli Lp-PLA2. V takovýchto případech pak funguje výhradně antiaterogenním způsobem.

Homeostáza Lp-PLA2 je ovlivněna poměrem a distribucí různých lipoproteinových tříd. U primární hypercholesterolemie Lp-PLA2 vázaná na LDL zvyšuje závažnost choroby. U homozygotní familiární hypercholesterolemie nacházíme velmi vysoké hodnoty vazby Lp-PLA2 na LDL. Ostatní druhy smíšených dyslipidemií, jako je tomu u diabetes mellitus, se funkce a distribuce Lp-PLA2 může různě měnit. Shrňeme-li to, pak LDL částice jsou cirkulujícím rezervoárem pro Lp-PLA2, který zůstává neaktivní, dokud LDL neprojde oxidací. Po oxidaci LDL v arteriální stěně se krátká acylová skupina na *sn*-2 pozici fosfolipidů stane náchylnější k hydrolýze Lp-PLA2. Výsledkem zmíněné reakce jsou dva silné prozánětlivé a proaterogenní mediátory, jmenovitě pak jde o

lysofosfatidylcholin a oxidovanou mastnou kyselinu. Reakce je vykreslena na schématu níže.



### Schéma 3 – Mechanismus účinku Lipoprotein asociované fosfolipázy A2

Oxidované fosfolipidy (oxPC) jsou hydrolyzovány na lysofosfatidylcholin (lysoPC) a oxidované neesterifikované mastné kyseliny (oxNEFA) (Macphee, Nelson and Zalewski, 2006)

#### 4.4. Lp-PLA2, pohlaví, věk a rasa

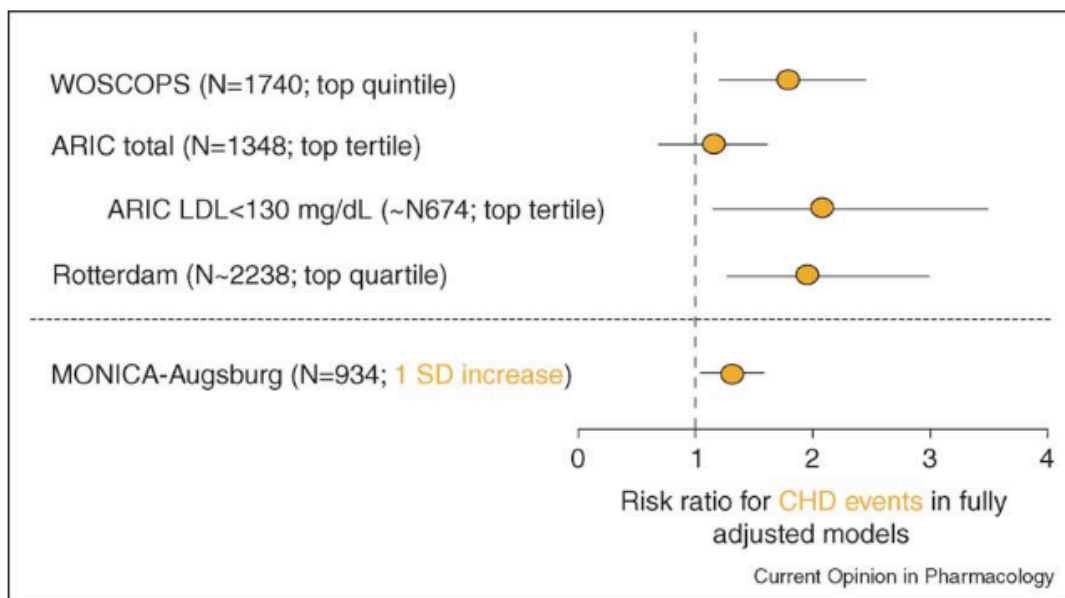
Kosaka a kol. změřili Lp-PLA2 aktivitu u více než 3000 zdravých Japonců. U žen prokázalo měření výrazně nižší Lp-PLA2 aktivitu než u mužů (Kosaka et al., 2001). Tato zjištění byla později potvrzena v AtheroGene studii, jejíž zkoumaný vzorek populace zahrnoval pacienty z Evropy, přes Severní Ameriku a Austrálii (Blankenberg et al. 2003).

Podobně, jako se liší aktivita Lp-PLA2 u pohlaví, je tomu tak i v případě věku. Roste s věkem (Kosaka et al., 2001). Avšak u žen pod 50 let byla naměřena nižší hladina Lp-PLA2 ve srovnání s muži. Možné důvody jsou spojovány s hladinou hormonů, jelikož hormonální terapie snižuje Lp-PLA2.

V Dallas Heart Study byl zkoumán rasovo-etnický původ jako další hledisko rozdílů u Lp-PLA2. Vzorek populace čítal 3332 zdravých, multietnických účastníků výzkumu, z nichž se ukázala nižší aktivita Lp-PLA2 u afro-amerických a hispánských etnik než u kavkazských (Brilakis et al., 2005).

#### 4.5. Lp-PLA2 a kardiovaskulární onemocnění

Přítomnost mRNA transkriptu pro Lp-PLA2 v aterosklerotickém plaku bohatém na makrofágy byla prvně zmíněna v roce 1999 Hakkinenem (Hakkinen *et al.*, 1999). Od té doby pak stovky studií potvrzují či vyvrací souvislost elevace hladin Lp-PLA2 a přítomnost, predikci či prognostiku kardiovaskulárních chorob. V této kapitole je prováděna detailní analýza jednotlivých studií. Shrnutí některých zmíněných studií je znázorněno na schématu 4.



**Schéma 4 – Souhrn studií Lp-PLA2 jako prediktivního markeru nepříznivé kardiovaskulární příhody u jedinců bez předchozího koronárního onemocnění**

(ARIC = Atherosclerosis Risk in Communities, MONICA = Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease, WOSCOPS = West of Scotland Coronary Prevention Study. Taken from (Macphee, Nelson and Zalewski, 2006)

#### 4.6. Lp-PLA2 a cévní mozková příhoda

Lp-PLA2 se také ukázala jako nezávislý prediktor budoucího zvýšeného rizika akutní mozkové příhody. Nejdostupnější literatura je založena na případových studiích. V této kapitole je prováděna taktéž detailní analýza jednotlivých studií.

#### **4.7. Lp-PLA2 a rekurentní kardiovaskulární onemocnění**

Lp-PLA2 se také zdá být rizikovým faktorem pro rekurentní kardiovaskulární příhody u pacientů s již rozvinutými kardiovaskulárními potížemi (tzn. v rámci sekundární prevence). Celkově je zde podrobně popsáno a analyzováno devět studií.

Studie JUPITER (Justification for the Use of Statin in Prevention: and Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin, pro primární prevenci kardiovaskulárních příhod) a HPSCG (Heart Protection Study Collaborative Group, pro sekundární prevenci kardiovaskulárních příhod) vyhodnotili výsledky od téměř 37 000 jedinců užívajících statiny. U pacientů užívajících účinné dávky statinů se výrazně změnil vztah mezi Lp-PLA2 a KV chorobami. Vzhledem k tomu, že se Lp-PLA2 většinou váže na apoB, statiny nejen snížily LDL-C, ale i aktivitu Lp-PLA2 a hmotnostní koncentraci v obou studiích. Toto vede k otázce, zda je Lp-PLA2 skutečně nezávislým rizikovým faktorem pro KV choroby, zda dodává přidanou hodnotu ve stratifikaci rizik a zda je vhodné upravovat léčebné postupy dle jejích hodnot. Je také podstatné zmínit, že snížení rizika KV chorob bylo v těchto případech vázáno na léčbu statiny, nikoliv na iniciální hodnotu Lp-PLA2 (Stein, 2012). Toto velmi zužuje využití měření Lp-PLA2 u pacientů léčených statiny, myšleno u všech pacientů po kardiovaskulární příhodě (v rámci sekundární prevence) a ve značné míře i u pacientů v rámci primární prevence.

#### **4.8. Lp-PLA2 a recidivující cévní mozkové příhody**

Tři studie zjistily zvýšené riziko recidivy cévní mozkové příhody u těch jedinců, kteří měli zvýšenou základní hladinu aktivity nebo hmotnostní koncentrace Lp-PLA2. Jsou také blíže zanalyzovány v disertační práci.

#### **4.9. Současný state of the art – metaanalýzy**

Kvůli neprůkazným výsledkům z předešlých epidemiologických šetření se několik nedávných metaanalýz pokusilo najít konsensus v hodnocení Lp-PLA2 aktivity či hmotnostní koncentrace jako indikátoru kardiovaskulárních chorob. Většina z těchto metaanalýz uvedla souvztažnost mezi Lp-PLA2 hmotnostní koncentrací a (obzvláště pak) její aktivitou a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob. Některé také poukázaly na to, že hodnověrnost statistických pokusů ve snaze odlišit efekt Lp-PLA2 od účinků proaterogenních lipidů (např. apoB) zůstává nejistá.

Nejnovější a nejrozsáhlejší dostupná metaanalýza zahrnuje celkovou populaci 157 693 jedinců. Po úpravě pro mnohočetné konvenční rizikové faktory, byly zvýšené hodnoty aktivity i koncentrační hmotnosti Lp-PLA2 asociovány se zvýšeným rizikem cévní mozkové příhody (o 7 a 11 %) (Hu et al., 2019).

#### **4.10. Genomové variace**

Kvůli těmto výše zmíněným neprůkazným výsledkům, je třeba lépe pochopit funkce Lp-PLA2. Její působení se může podstatně lišit v závislosti na tom, zda je vázána na LDL nebo HDL částice. Činnost Lp-PLA2 a hladina HDL jsou často nepřímě spojovány, ale toto je pravděpodobně vysvětleno faktem, že málo denzní LDL částice (s vysokou Lp-PLA2 aktivitou) jsou u pacientů s nízkou hladinou HDL hojnější. Zkoumáním toho, jak genetické variace mění expresi Lp-PLA2, její vlastnosti a funkce, může pomoci pochopit tyto nezodpovězené otázky. Studie dědičnosti prokázaly, že genetické faktory jsou příčinou přibližně 62 % variací v aktivitě Lp-PLA2. Jako možné původci změn exprese tohoto enzymu bylo identifikováno několik missense mutací (např. G<sup>994</sup> na T v exonu 9 genu pro Lp-PLA2), polymorfismy (na APOE/APOC1 v oblasti chromozomu 12, CELSR2/PSRC1 na chromozomu 1, SCARB1 na chromozomu 12 a ZNF259/BUD13 v APOA5/APOA1 v genové oblasti na chromozomu 11) a jednonukleotidový polymorfismus (SNPs) na chromozomu 6p12.3 blízko genu PLA2G7. Navzdory genovým studiím, které se rozsáhle zabývaly desítkami forem polymorfismu, se u konkrétních etnických skupin nemusí přítomné mutace projevit (např. G<sup>994</sup> na T může najít u 25 % japonské populace) a podle jejich vlivu na aktivitu či koncentraci Lp-PLA2 mohou být některé považovány za rizikové faktory aterosklerózy (kupříkladu R92H polymorfismus) a některé naopak za faktory ochranné (V279F polymorfismus).

#### **4.11. Lp-PLA2 inhibitory**

Kvůli velkému počtu důkazů uvedených v této práci je farmakologická inhibice přirozeným krokem ve výzkumu Lp-PLA2 a její role v léčbě KV chorob.

V roce 2003 byl identifikován silný a reversibilní inhibitor enzymu Lp-PLA2 (darapladib) a testován na Watanabe králících s dědičně podmíněnou hyperlipidémií (Blackie et al., 2003) a na praseti s diabetem mellitus, hypercholesterolémií a s akcelerovanou aterosklerózou. Po období indukce ke zvýšení hladin Lp-PLA2 byla zahájena léčba darapladibem a vyústila ve významné snížení rozvoje koronární

aterosklerózy (léčené léze byly méně závažné, obsahovaly méně makrofágů a prokázaly menší nekrotická jádra) a potlačila následnou progresi k pokročilejším lézím (Wilensky et al., 2008). Koncentrace cholesterolu nebyla ovlivněna Lp-PLA2 inhibicí. V následné studii u člověka, darapladib zastavil expanzi nekrotických jader ve srovnání s pacienty, kteří dostávali pouze placebo (Serruys et al., 2008).

Po těchto slibných výsledcích dvojité slepé studie STABILITY (STabilization of Atherosclerotic plaque By Initiation of darapLadib TherapY) zkoumala 15,828 pacientů se stabilní koronární srdeční chorobou a přítomností alespoň jednoho rizikového faktoru. Pacientům bylo podáno buď 160 mg darapladibu denně nebo placebo. Průměrný follow-up trval 3,7 let a nebyl zjištěn statisticky významný efekt na primární cílové ukazatele (kardiovaskulární smrt, infarkt myokardu či mozkovou mrtvici) nebo povšechnou mortalitu (Harvey D.White et al., 2014).

Jiná dvojité slepá placebem kontrolovaná studie, SOLID-TIMI 52 (The Stabilization Of pLaques using Darapladib – Thrombolysis In Myocardial Infarction 52) čítající 13,026 pacientů neodhalila žádné snížení velkých koronárních příhod při přidání darapladibu ke standardní péči po akutním koronárním syndromu (Donoghue et al., 2015).

Tyto výsledky mohou být jistým zklamáním částečně proto, že se pojí s nedostatkem pochopení fyziologie a funkce Lp-PLA2. Provedení mnohočetných korelačních studií před rozvinutím bližších poznatků o fyziologii a funkci Lp-PLA2 možná vedlo k mylným koncepcím, jež byly dále rozpracovány v literatuře.

## **5. Ateroskleróza**

Protože je Lp-PLA2 úzce spojena s procesem aterosklerózy, je důležité přezkoumat současné koncepce patogeneze a rozvoje aterosklerózy.

### **5.1. Tukové proužky**

Tukové proužky představují nejranější aterosklerotické léze. Zdá se, že vznikají z fokální endoteliální dysfunkce nebo poranění jinak morfologicky intaktního endotelu a jsou charakterizovány místním nárůstem počtu lipoproteinů, které se váží na komponenty extracelulární matrix, kupříkladu glykosaminoglykany a glykoproteiny. Tyto molekuly jsou náchylné k oxidační modifikaci za vzniku hydroxyperoxidů, lysofosfolipidů, oxysterolů a produktů aldehydického štěpení mastných kyselin a fosfolipidů. Tyto

produkty spouští místní zánětlivou reakci, pro kterou je typická chemotaxe leukocytů. Nelaminární průtok krve snižuje produkci oxidu dusnatého. Oxidační stres je zesílen činností Lp-PLA2. Destičky hrají také podstatnou roli při tvorbě trombózy (aterotrombózy) v přetrvávajícím zánětlivém prostředí tím, že vylučují několik vazoaktivních chemokinů a cytokinů jako jsou trombospondin a PAF (Pant et al., 2014). Podněcují fibrózu aterosklerotického plaku sekrecí růstového faktoru z destiček (PDGF) a transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), zvyšují migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny. Jakmile se integrita endotelu poruší, destičky se začnou ve velkém shlukovat. Odhalení vysoce trombogenní extracelulární matrix vytváří mikrotromby bohatých na destičky.

Ve všech stádiích aterosklerózy je zánětlivý proces dále umocněn uvolněním velkého množství reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je superoxid a peroxid vodíku. ROS má několik podstatných důsledků. Denaturují oxid dusnatý, aktivují destičky, vyvolávají proliferaci hladké svaloviny, oxidují proaterogenní lipidy včetně LDL a chovají se jako chemoatraktanty. Oxidované LDL poté vyvolají uvolnění ještě více prozánětlivých cytokinů, aktivují proteázy, vedou k buněčné apoptóze a dokončují *circulus vitiosus* zánětu způsobeného zánětem.

## **5.2. Formování pěnových buněk**

Jakmile subintimální monocyty dozrají do makrofágů, začínají pohlcovat oxidovaný LDL a přetvářet jej do pěnových buněk. Tento proces je zprostředkováván endocytózou přes scavenger receptor a není řízen přes LDL receptory (jedinci s dědičnou homozygotní hypercholesterolemií mají také pěnové buňky). Obrácený transport pěnových buněk a cholesterolu prováděný intaktním HDL může zpozdit tvorbu aterosklerotického plátu. Jakmile množství lipidů vstupujících do arteriální stěny překročí množství odstraněných, pěnové buňky se začnou akumulovat a zvětšují intimální lézi. U některých z nich pak může dojít k apoptóze, vzniká nekrotické jádro jako projev pokročilejšího aterosklerotického plátu.

### 5.3. Aterom

U jedinců s predispozicí a kontinuální expozicí rizikovým faktorům aterosklerózy (např. dyslipidémie, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, kouření, obezita, neaktivní životní styl a věk) se utváří aterom (také označovany jako ateromatózní nebo aterosklerotický plát).

Hlavní části aterosklerotického plátu jsou 1) buňky včetně makrofágů, T-lymfocyty a buňky hladké svaloviny; 2) extracelulární matrix obsahující kolagen, elastická vlákna a proteoglykany a 3) extracelulární a intracelulární lipidová depozita. Tyto komponenty tvoří komplexní organizované struktury pokryté fibrózní čepičkou, pod níž dochází k migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny vyvolané produkcí cytokinů. Stěžejní význam má IL-1 a TNF- $\alpha$ , jež vyvolávají místní produkci růstových faktorů, jakými jsou například PDGF a TGF- $\beta$ . Tento stav značí přechod z obvyčejného shromažďování pěnových buněk k fibro-tukovým lézím.

Při apoptóze pěnových buněk dochází k uvolnění cholesterolu, jež se ukládá do cévních stěn, a co je důležitější, ukládají se i protrombotické molekuly a metaloproteinázy. Zvýšené hladiny Lp-PLA2 a lysofosfatidylcholinu se nacházejí v tenké fibrózní čepičce fibroateromu a v prasklých aterosklerotických plátech. Ve stabilních lézích jsou téměř nepřítomny.

### 5.4. Utváření nekrotických jader

Termín nekrotické jádro může být zavádějící (alespoň v počáteční fázi), protože je charakterizován přítomností nebuněčného materiálu bohatého na lipidy v intimě, a ne nezbytně morfologickou přítomností mrtvých buněk z předešlých živých tkání nebo buněk. Společně s akumulací apoptických zbytků jsou uvolněny lipidy, prozánětlivé mediátory a metaloproteinázy a následně dochází k sekundární nekróze. Jak roste plát, tak se apoptické pěnové buňky a buňky hladké svaloviny nacházejí zejména na jeho povrchu, kdežto v jádře je nekrotická hmota obsahující velké množství zoxidovaných fosfolipidů (kvůli nízké clearance a autooxidaci). Ty pak přispívají k expanzi nekrotických jader, poranění nové cévní tkáně, vnitroplátovému krvácení a nestabilitě plátu.



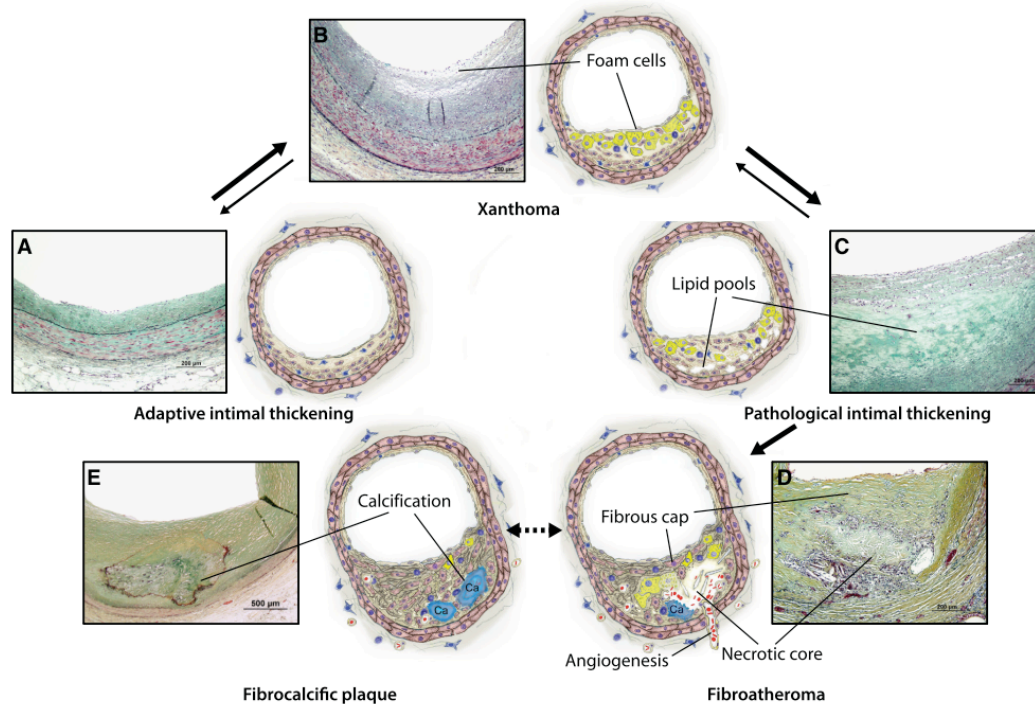
## 5.5. Angiogeneze

Jak aterosklerotické léze postupně rostou, rozvíjí se četné plexy mikrocév, které vycházejí z arteriální vasa vasorum v tunica adventicia. Zajišťují náhradní vstup pro další prozánětlivé buňky, zvyšují průtok živin a kyslíku, možná takto podporují vývoj a utváření plátu. Tyto nově vzniklé cévy jsou velmi křehké, nedostatečně vyztužené buňkami a snadno prosakují. Tento stav ústí v nitroplátové krvácení, což může způsobit trombózu in situ, lokální generaci trombinu, a to může na oplátku aktivovat buňky hladké svaloviny a endotelu.

## 5.6. Fibróza a kalcifikace

Migrace a proliferace buněk hladké svaloviny z medie do vnitřní části arteriální stěny, kde je umístěno nekrotické jádro, je spojeno se sekrecí kolagenu, elastinu a proteoglykanů. Zpočátku je nově utvořená pojivová tkáň převážně volná a vláknitá. Pak je nahrazena na kolagen bohatou fibrotickou tkání, který, jak plát postupuje, se stává hlavním komponentem. Apoptické buňky, extracelulární matrix a hmota z nekrotických jader se může stát nidem pro mikroskopické kalciová depozita, jež následně rostou do formy větších hrudek a plátů (Bentzon et al., 2014).

Vývoj aterosklerotického plátu je výsledkem jakési rovnováhy mezi 1) leukocyty a lipoproteiny vstupujícími a opouštějícími lézi, 2) proliferací a zánikem buněk, 3) produkcí extracelulární matrix a přestavbou, kalcifikací a neovaskularizací. Mnohočetné a často soupeřící signály, které tyto procesy regulují, jsou nepřetržitě ovlivňovány expozicí rizikovým faktorům aterosklerózy. Výše popsany proces je znázorněn na schématu č. 5.



**Schéma 5 - Histologická klasifikace dle Virmaniho (Virmani et al., 2000)**

### 5.7. Ruptura aterosklerotického plátu

Dokud velikost aterosklerotického plátu nedosáhne přibližně 40 % plochy okolní lamina elastica interna, plát nezužuje arteriální lumen. Jinými slovy většinu svého růstového cyklu aterom roste abluminálně a zachovává průsvit cévy.

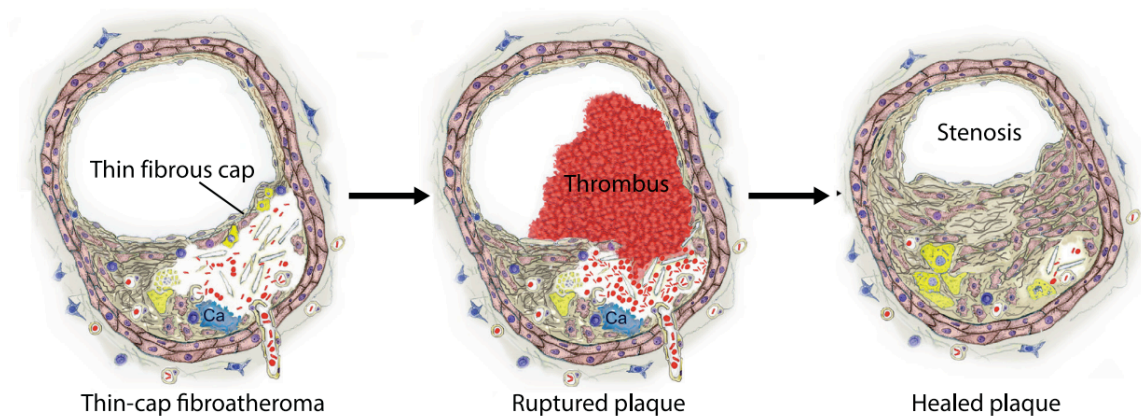
Jestliže je růst aterosklerotického plátu stabilní a chronický, vnitřek cévy se časem nakonec zúží a vede k rozvoji klinického syndromu stabilní anginy pectoris nebo intermitentních klaudikací dolních končetin. Opakované lokální hypoxické stavy, způsobené neschopností dodání kyslíku během zvýšené fyzické práce, podporuje vznik kolaterálních cév. Fibrózní čepička aterosklerotického plátu praskne, odhalí vysoce trombogenní kolagen a tkáňový faktor vedoucí k trombóze cév s devastujícími následky (jako je akutní koronární syndrom nebo náhlá srdeční smrt).

Prasklý aterosklerotický plát je definován jako, cituji, „plát s hlubokým poškozením se skutečným defektem nebo trhlinou ve fibrózní čepičce, která do té doby oddělovala na lipidy bohaté ateromatózní jádro od proudící krve, a tím se obnažilo trombogenní jádro plátu (Schaar *et al.*, 2004). Neměla by být používána jiná matoucí

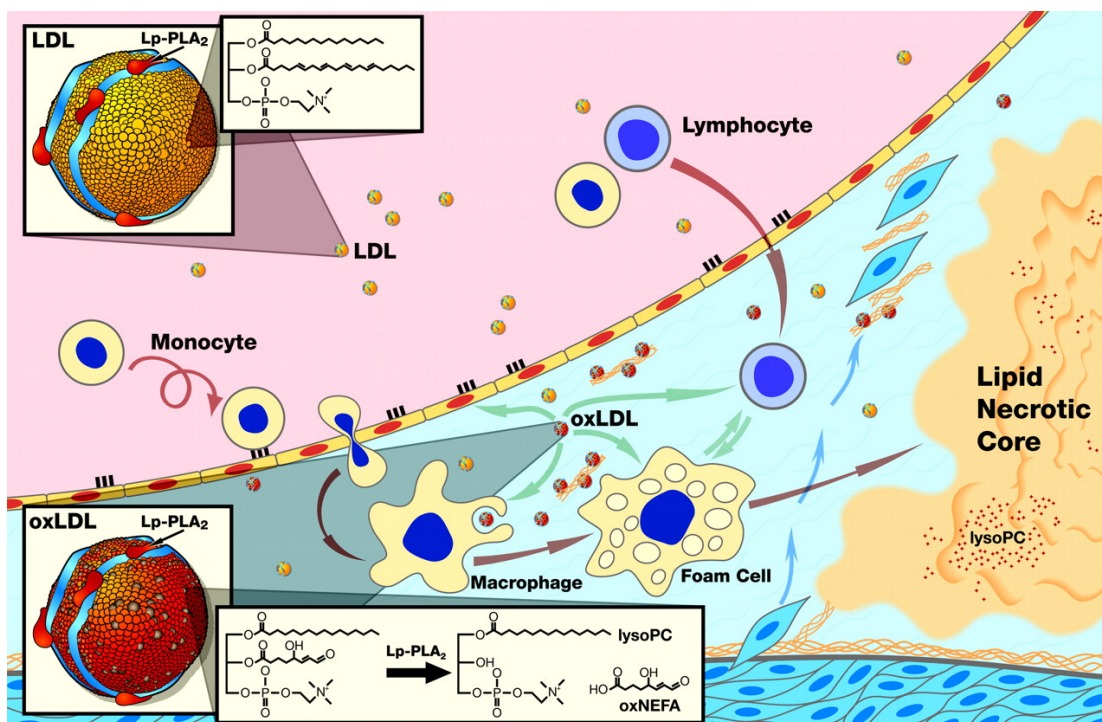
terminologie, kupříkladu disrupce nebo fisurace. Jakmile je přítomna trombóza, ale chybí mikroskopické známky ruptury plátu, užívá se termínu *eroze plátu* (Quillard et al., 2017).

Jedním z nejdůležitějších faktorů vedoucích k ruptuře aterosklerotického plátu a následné trombózy je tloušťka fibrózní čepičky. Protože čím tenčí je, tím je náchylnější k poškození. Byl zaveden termín aterosklerotická tenká čepička (TCFA) a zřejmě tento typ aterosklerotického plátu představuje prekurzor většiny fatálních ruptur koronárních plátů (Falk et al., 2013). Fibrózní čepičky se zužují a ztrácí buňky hladké svaloviny a kolagen, toto je dále potenciováno enzymy vylučovanými pěnivými buňkami, jako jsou proteázy, aktivátory plasminogenu a metaloproteinázy.

Shrneme-li to, aterosklerotické pláty s nejvyšším rizikem ruptury, zranitelnější nebo pláty nejnáchylnější ke vzniku nástěnné trombózy, jsou ty s velkým acelulárním, na lipidy bohatým nekrotickým jádrem překryté fibrózní čepičkou infiltrovanou prozánětlivými buňkami a difúzní kalcifikací. Národní vyobrazení ruptury plátu a hojení je popsáno na schématu č. 6. A konečně přehledné zobrazení veškerého aterosklerotického procesu a role molekuly Lp-PLA2 je zachyceno na schématu č. 7.



**Schéma 6 – Ruptura aterosklerotického plátu a hojení (Bentzon et al., 2014)**



**Schéma 7 – Přehledné zobrazení zmíněného aterosklerotického mechanismu Lp-PLA2 v cévní stěně.** Lp-PLA2 se váže na apoB na LDL, které přenáší Lp-PLA2 do aterosklerotické léze. Následná LDL oxidace vede ke vzniku oxidovaného fosfolipidu na pozici *sn*-2, jež je náchylný k enzymatické hydrolyze pomocí Lp-PLA2. Výsledkem toho je vznik lysofosfatidylcholinu (lysoPC) a oxidovaných neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA), které jsou prozánětlivými mediátory, cytotoxické k makrofágům, a usnadňují vznik nekrotických lipidových jader u rozvinutých aterosklerotických lézí (Zalewski and Macphee, 2005).

## 6. Stenóza aortální chlopně a transkatetrová implantace aortální chlopně

Aortální stenóza, tedy zúžení otvoru aortálního chlopně, je závažným a velmi častým onemocněním chlopně, které bývá v Evropě a Severní Americe řešeno operačně nebo katetrovou metodou. Prevalence roste s věkem, u věkové skupiny 65–74 let činí 1,3 %, u pacientů nad 75 let dokonce mezi 2,8 - 4,6 % (Iung and Vahanian, 2014). Z patofyziologického hlediska degenerativní kalcifikace aortální stenózy, stejně jako je ateroskleróza, představuje aktivní proliferativní a zánětlivý proces zapříčiněný poškozením endotelu v důsledku mechanického stresu a penetrací lipidů. Toto vede

k progredující obstrukci výtokového traktu levé komory kvůli fibróze, ztluštění cípů a kalcifikaci chlopně (Joseph et al., 2017). Tato progredující obstrukce je zpočátku asymptomatická (i po celé dekády), ale jakmile se dostaví symptomy, tj. dušnost, angina pectoris, srdečního selhání nebo synkopy, umírá 50 % pacientů do 2-3 let. Z toho důvodu je včasná diagnostika opravdu prvořadá. Nicméně se velmi často diagnostikuje až při rozvoji symptomů, tzn. již v pokročilém věku, u jedinců s vysokým operačním rizikem kvůli jiné komorbiditě. V takových případech je doporučována transkatetrová implantace aortální chlopně (TAVI) (Baumgartner et al., 2017).

Aortální stenóza se rozděluje do čtyř stupňů dle množství průtoku krve chlopní, transvalvulárního gradientu a ejekční frakce levé srdeční komory. Nízký průtok, nízký gradient aortální stenózy spolu se sníženou ejekční frakcí jsou u starších pacientů typickým fenotypem a mohou být sekundární k systolické dysfunkci levé komory nebo ke sníženému objemu komory při hypertrofii a nepoddajnosti levé komory. Tito pacienti mají horší prognózu dokonce i po chirurgické náhradě aortální chlopně (surgical aortic valve replacement, SAVR) nebo TAVI. V současnosti je TAVI indikována pouze u pacientů, u nichž není vhodné provést SAVR. Nicméně nedávné klinické studie ukázaly možnou nadřazenost TAVI, je-li použit transfemorální přístup (ne apikální) (Reardon et al., 2017) u starších nebo dokonce i u mladších dospělých pacientů s nízkým operačním až středním rizikem (Gargiulo et al., 2016). Balonová valvuloplastika (BV) se užívá jako paliativní metoda u pacientů, u nichž nemůže být provedena SAVR. U nestabilních pacientů může být také použita jako mezistupeň mezi SAVR nebo TAVI. Za zmínku stojí, že hemodynamický přínos angioplastiky chlopně je pouze dočasný a trvá obvykle jen 6 měsíců (Ben-Dor et al., 2013).

2017 ESC/EACTS Guidelines management for valvular heart disease (Baumgartner et al., 2017) doporučilo SAVR u pacientů s nízkým operačním rizikem dle výpočtu chirurgického rizika dle Society of Thoracic Surgeons nebo dle European System for Cardiac Operative Risk Evaluation (STS or EuroSCORE II < 4 % nebo logistic EuroSCORE I < 10 %). Žádné jiné faktory se do těchto hodnocení nezahrnují, kupříkladu frailty syndrom, porcelánová aorta nebo postradiační změny hrudníku. Rozhodnutí, zda zvolit SAVR nebo TAVI u jakéhokoli pacienta nezahrnutého do této skupiny, by měl provést kardiologický tým, přičemž TAVI by mělo být upřednostněno u starších pacientů, u nichž je možné provést intervenci transfemorálním přístupem.

## 7. Diabetická dyslipidemie

Za diabetickou dyslipidemií se označuje souhrn lipidových abnormalit u diabetiků, pro které je charakteristický nárůst koncentrace triglyceridů (TAG), snížená koncentrace HDL cholesterolu (HDL-C) a kvalitativní změny LDL frakce, kde dochází ke zvyšování poměru ve prospěch malých a hustších LDL (Arca, Pigna and Favocchia, 2012). Tato triáda může být detekována dokonce roky před samotnou diagnózou diabetes mellitus 2. typu (DM2). Roste počet důkazů o tom, že pacienti s DM2 mají abnormálně zvýšenou jaterní syntézu VLDL (Adiels et al, 2005). Rychlost produkce VLDL je hlavním determinantem TAG koncentrace v krevní plazmě.

V tukové tkáni potlačuje inzulin lipolýzu inhibicí aktivity hormon-senzitivní lipázy, enzymu zodpovědným za mobilizaci volných mastných kyselin z uložených TAG. To znamená, že inzulin reguluje množství cirkulujících mastných kyselin a ve stavu inzulinové rezistence není schopen inhibovat hormon-senzitivní lipázu. Následná vyšší dostupnost volných mastných kyselin vede ke snížení degradace apoB způsobující nadprodukcí VLDL játry (syntéza VLDL začíná shlukováním TAG s apoB).

Navíc vyšší množství volných mastných kyselin může poškodit činnost lipoproteinové lipázy (tím, že jí odštěpí od endotelu) ústící ve sníženou clearance VLDL. Obojí, jak nadprodukce, tak snížená clearance VLDL se podílí na hypertriglyceridémii pozorované u diabetických pacientů. Lp-PLA2 je také potlačována apoC-III. Produkce apoC-III je vyvolána glukózou a potlačena inzulinem. Tedy vysoké koncentrace apoC-III brání clearance lipoproteinů bohatých na TAG a jejich reziduí, což má za následek další zvýšení triglyceridů.

Nejen kvůli výše zmíněným vlastnostem, ale také kvůli změnám inkretinové sekrece pozorované u inzulinové rezistence, stoupá množství postprandiálních chylomikronů bohatých na triglyceridy. Pro jejich soupeření s VLDL o stejnou clearance dráhu, nemohou být účinně odstraněny. Stručně řečeno, DM2T je charakterizována obojím, jak lačnou, tak postprandiální hypertriglyceridemií.

Hypertriglyceridemie stimuluje aktivitu lipidového cholesterol ester transfer proteinu (CETP), který umožňuje přenos TAG z lipoproteinů bohatých na TAG na HDL a LDL. HDL obohacený o TAG podléhá zvýšenému katabolismu, který zkracuje jeho poločas rozpadu, a tudíž snižuje i jeho koncentraci. Snížená koncentrace HDL může vyústit v abnormální regulaci glukózové homeostázy. LDL obohacené o TAG jsou hydrolyzovány

lipoproteinovou lipázou nebo hepatickou lipázou, což končíva redukcí velikosti částic, dává vzniknout malým denzním LDL charakteristickým pro diabetickou dyslipidemii (Wu and Parhofer, 2014). Malé denzní LDL částice jsou více aterogenní, náchylnější k vyčítávání scavenger receptory a zvyšují vazebnou afinitu Lp-PLA2 na apoB. Podotýkám, že celkové množství LDL částic nutně neodráží LDL koncentraci (LDL-C), protože množství cholesterolu, které nese každá částice je různé. Kdybychom chtěli změřit počet částic, apoB koncentrace by byla zástupným znakem pro celkový počet aterogenních lipoproteinových částic, kdy by každý LDL, VLDL, středně denzní lipoprotein a lipoprotein (a) obsahoval jeden apoB.

Protože se Lp-PLA2 primárně váže na tyto malé denzní LDL částice, které jsou charakteristické pro DM, může lepší glykemická kontrola snížit činnost Lp-PLA2. Odhaduje se, že množství Lp-PLA2 v malých denzních LDL či elektronegativních LDL je 5 až 10krát vyšší než u běžně velkých LDL částic. Mimoto frakce Lp-PLA2 vázaná na HDL je nižší (kvůli relativně nižší frakci HDL částic u diabetické dyslipidemie) a lepší glykemická kontrola zvyšuje míru Lp-PLA2 vázané na HDL, a tím pravděpodobně i svou potenciálně ateroprotektivní vlastnost. Dále, množství lysofosfatidylcholinu v cirkulujícím LDL je u diabetických pacientů také zvýšeno (Sonoki et al., 2009). Tento fakt může souviset se zvýšenou aktivitou Lp-PLA2.

DM *per se* zvyšuje riziko KV chorob dvou až čtyřnásobné (Cho et al., 2002). Toto riziko je silně determinováno přítomností poškození cílových orgánů (včetně nefropatie, neuropatie a retinopatie). Avšak většina konkomitantních komorbidit jako jsou hypertenze, dyslipidemie, abdominální obezita a nealkoholová steatóza jater, zvyšují toto riziko mnohonásobněkrát.

## 8. Cíle studie

- a) určit, zda se hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 zvyšuje u geriatrických diabetických pacientů ve srovnání s nediabetickými
- b) zhodnotit, zda se koncentrace Lp-PLA2 mění po klinické intervenci (po manipulaci se srdečními chlopněmi)
- c) určit, zda se tyto změny různí mezi diabetickými a nediabetickými geriatrickými pacienty
- d) zanalyzovat současné odborné pohledy na molekulu Lp-PLA2.

## 9. Metody, statistické analýzy

Provedli jsme průřezovou analýzu na 44 geriatrických pacientech ve věku  $79.9 \pm 5,6$  let, kteří podstoupili TAVI nebo BV jako léčbu těžké aortální stenózy. Pacienti byli přijati na Kardioangiologickou kliniku Fakultní nemocnice Hradec Králové, ČR, mezi lednem 2009 a lednem 2011. Zkoumané znaky jsou popsány v tabulce 1. Většina pacientů trpěla četnými komorbiditami, ale důvod jejich příjmu souvisel s jejich srdečními problémy. Dva z nich prodělali BV před TAVI (jeden 8 měsíců před a druhý pacient 1 měsíc před); jeden potřeboval BV 3 měsíce po TAVI kvůli perivalvulárnímu leaku. Vzorek byl dále rozdělen na diabetické a nediatetické pacienty. Místní etická komise schválila studii a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Total of subjects enrolled	44
Male	19 (43.2 %)
Age (years)	$79.6 \pm 5.6$
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$27.6 \pm 4.7$
Systolic BP (mmHg)	$133 \pm 18$
Diastolic BP (mmHg)	$75 \pm 10$
Total patients after TAVI	35
a) apical route	8
b) femoral route	27
Total patients after BV	9
Total patients with DM	21 (47.7 %)
a) on insulin therapy	9
b) on per oral antidiabetics	3
c) DM controlled by diet	9

**Tabulka 1 – Charakteristiky subjektů**

Měření jsou vyjádřena ve standardní odchylce nebo jako absolutní číslo. BMI = index tělesné hmotnosti, BP = krevní tlak, TAVI = transkatetrová implantace aortálních chlopní, DM = diabetes mellitus, BV = balónková valvuloplastika

Plazmatická Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace byla získána využitím ELISA metody (Cloud-Clone Corp., USA) před procedurou a 3 dny po proceduře. Výrobce doporučené instrukce byly plně dodrženy. Intraassay variace byly  $< 10 \%$  a interassay



variace byly < 12 %. Detekční rozmezí ELISA metody bylo 0.625 – 40 ng/mL. Barevné emise byly následně měřeny přístrojem Multiscan Microplate Spectrophotometer od Thermofisher Scientific.

Na vnitřní stranu mikrotitračních jamek byla aplikována specifická protilátka proti Lp-PLA2. Poté byl aplikován krevní vzorek a Lp-PLA2 se navázala na svou protilátku. Po vymytí nenavázaných komponent z mikrotitračních jamek byla přidána druhá protilátka proti Lp-PLA2 označená biotinem. Následovalo druhé promytí a poté se přidala křenová peroxidáza s navázaným avidinem. Avidin reaguje s biotinem a utváří avidin-biotinový komplex. Po třetím vymytí vzorku byl přidán indikátor reakce. Ten mění barvu v přítomnosti křenové peroxidázy. Intenzita barvy je pak úměrná množství křenové peroxidázy navázané na komplexu a v důsledku toho i množství Lp-PLA2 ve vzorku. Měření bylo provedeno speciálním fotometrem a zanalyzováno vhodným softwarem, který vyhodnotil vztahy mezi barevnými emisemi a množstvím Lp-PLA2 ve vzorku dle standartních kalibrovaných vzorků.

Vzorky krve nalačno byly získány od každého pacienta ihned před a tři dny po kardiovaskulární proceduře. Krev byla odebrána a ihned odstředěna v centrifuze. Poté bylo odděleno sérum a uskladněno při -80°C. Celkový cholesterol, HDL-C a TAG byly měřeny enzymatickými metodami; LDL-C byl změřen rutinními metodami.

Pro statistickou analýzu byl použit volně dostupný PSPP software (Free Software Foundation Inc., USA). *P*-hodnota nižší než 0,05 značí přítomnost statisticky významného rozdílu. Pro srovnání hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 před a po intervenci na chlopni byl proveden párový *t*-test. Stejně tak byly propočteny korelace mezi Lp-PLA2 hmotnostní koncentrací a jinými hodnotami za pomoci Pearsonova korelačního koeficientu. K výpočtu rozdílu mezi dvěma skupinami (diabetiky a nediabetiky, TAVI a BV) byl použit nepárový *t*-test.

Do studie jsme zahrnuli 48 zdravých jedinců průměrného věku  $82.9 \pm 4,2$  let žijících v pečovatelském domě. Průměrná hodnota Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace kontrolní výše zmíněné skupiny byla  $788.23 \pm 210.95$  ng/ml. Věk jedinců v rámci výzkumu se statisticky nelišil.

## 10. Výsledky

Co se týče základních demografických a klinických charakteristik, zkoumali jsme 44 pacientů ve věku  $79.6 \pm 5.6$  let (průměrný věk  $\pm$  standardní odchylka). Přičemž 43,2 % z těchto 44 pacientů byli muži. Celkový průměr BMI (počítán jako podíl váhy jedince jeho výškou v metrech čtverečních) spadá do kategorie nadváhy ( $27.6 \pm 4.7$ ). Naměřený celkový cholesterol byl  $4.16 \pm 1.17$  mmol/l, LDL-C  $2.48 \pm 0.96$  mmol/l, HDL-C  $1.25 \pm 0.44$  mmol/l a koncentrace TAG byla  $1.36 \pm 0.66$  mmol/l jak je znázorněno v tabulce 2.

Total cholesterol (mmol/l)	$4.16 \pm 1.17$
HDL-C (mmol/l)	$1.25 \pm 0.44$
LDL-C (mmol/l)	$2.48 \pm 0.96$
Triglycerides (mmol/l)	$1.36 \pm 0.66$
CRP (mg/l)	20.8 [0.5 – 75.1]
Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/ml)	$1320 \pm 342$
a) Lp-PLA <sub>2</sub> on TAVI group	$1296 \pm 358$
b) Lp-PLA <sub>2</sub> on BV group	$1413 \pm 268$

**Tabulka 2 – Výsledky příslušných parametrů studované populace**

Měření jsou vyjádřena jako příslušná standardní odchylka nebo jako absolutní číslo s výjimkou CRP (kde je použit medián a rozsah). HDL-C = koncentrace lipoproteinu s vysokou denzitou, LDL-C = koncentrace lipoproteinu s nízkou denzitou, CRP = C-reaktivní protein, Lp-PLA<sub>2</sub> = lipoprotein asociovaná fosfolipáza A<sub>2</sub>, BV = balónková valvuloplastika

Dle 2019 ESC/EAS Guidelines for Management of Dyslipidemias je skleróza aortální chlopně (kalcifikace aortálních cípů bez významnějšího transvalvulárního gradientu) spojována se zvýšeným rizikem KV chorob, a to dokonce i v případě, nejsou-li přítomny rizikové faktory. U těchto pacientů však statinová terapie selhala ve smyslu snížení klinické progrese aortální stenózy a bylo vydáno doporučení proti zahajování hypolipidemické terapie u pacientů se stenózou aortální chlopně bez jiných KV chorob. I přes to, že lipidogramy měřené v naší studii byly v normálním rozmezí, tak vzorek populace, který byl podroben zkoumání, trpěl těžkou aortální stenózou. Mnoho pacientů prodělalo v minulosti infarkt myokardu, měli anamnézu hyperlipidemie a 62 % z nich

bylo na statinové léčbě. Proto tito pacienti mohou být automaticky zařazeni do vysokého nebo velmi vysokého kardiovaskulárního rizika. Pro ně je doporučená cílová hladina LDL-C nižší (< 1.8 pro vysoké riziko a < 1.4 mmol/l pro velmi vysoké riziko).

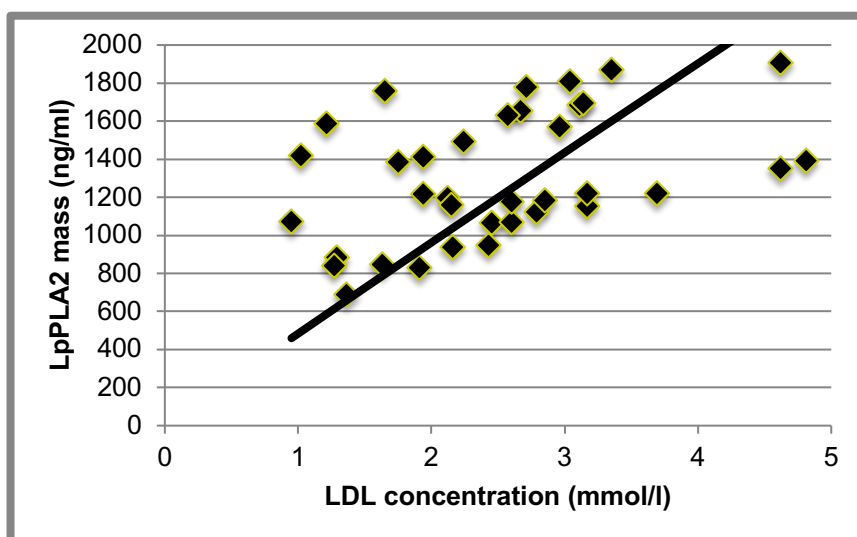
Z celkového počtu 44 pacientů, 21 (47,7 %) mělo anamnézu diabetu a byli na inzulinové terapii (N=9), na perorálních antidiabetikách (N=3) nebo nemedikovaní, na dietě (N=9).

Hlavním cíl studie bylo posouzení koncentrace Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace na vybraném vzorku geriatrických pacientů. Nicméně jsme sledovali danou populaci během následujících dvou let a taktéž jsme sledovali další parametry (např. povšechnou mortalitu, velké cévní mozkové příhody, infarkt myokardu, život ohrožující krvácení, velké vaskulární komplikace a akutní poškození ledvin). Jeden pacient (3 %) zemřel na cerebrovaskulární příhodu po TAVI. Během dvouletého sledování, jsme zaznamenali pět (11 %) úmrtí (2 na cévní mozkovou příhodu, 2 na infekční komplikace a jedno na následky autonehody).

Hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 výrazně korelovala s relevantními kardiovaskulárními rizikovými faktory (jak ukazuje tabulka 3). Dle původních předpokladů byly zjištěny silné korelace mezi hmotností koncentrací Lp-PLA2 a LDL-C (koeficient 0.40,  $P = 0.01$ ), jelikož částice LDL jsou hlavními nosiči Lp-PLA2 (schéma 8). Avšak nejsilněji korelovaly Lp-PLA2 koncentrace a TAG koncentrace (koeficient 0.43,  $P = 0.01$ ). Hmotnostní koncentrace zkoumaného enzymu nekorelovala s BMI ani s HDL-C.

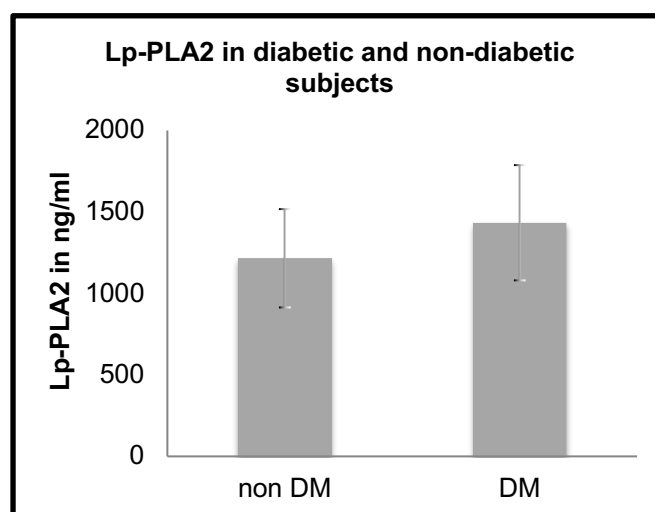
Parameters	Coefficient	<i>P</i>
Age	-0.14	NS
Total cholesterol	0.35	<i>0.04</i>
HDL-C	-0.14	0.41
LDL-C	0.40	<i>0.01</i>
Total cholesterol to HDL-C ratio	0.37	<i>0.03</i>
LDL-C to HDL-C ratio	0.36	<i>0.03</i>
Triglycerides	0.43	<i>0.01</i>
BMI	-0.30	0.87

**Tabulka 3 – Pearsonova korelace mezi Lp-PLA2 a ostatními parametry**



**Schéma 8 – Pearsonova korelace mezi Lp-PLA2 a LDL-C**

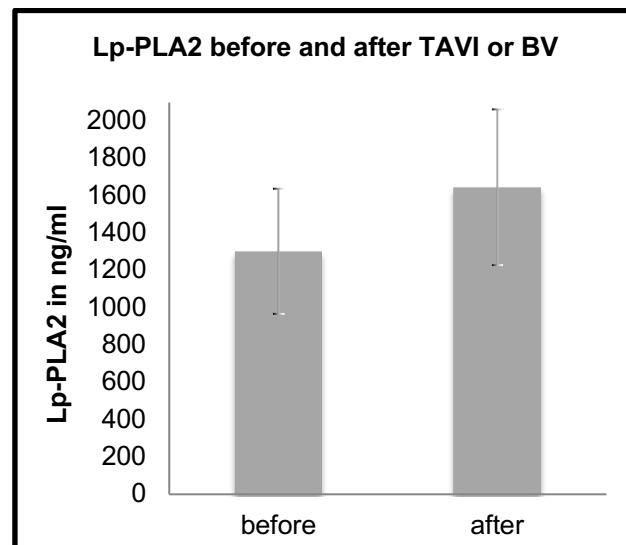
V této studii byla populace rozdělena na diabetiky a nediabetiky kvůli případnému srovnání hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 mezi oběma skupinami. Diagnóza diabetu byla zjištěna ze zdravotních záznamů pacientů. Nebrali jsme však v potaz, zda diabetičtí pacienti byli léčeni dietou, perorálními antidiabetiky nebo inzulinem. Použití nepárového *t*-testu nás dovedlo k závěru, že hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 je statisticky významně zvýšena ( $p=0.03$ ) u diabetické skupiny pacientů ( $1433.75 \pm 353.58$  ng/ml) ve srovnání s nediabetiky ( $1215.7 \pm 301.64$  ng/ml). Tyto výsledky byly získány před intervencí na aortální chlopni a jsou uvedeny ve schématu 9.



**Schéma 9 – Lp-PLA<sub>2</sub> koncentrace byla významně zvýšena u diabetických pacientů**  
DM / non DM = pacienti s/bez diabetes mellitus

Co se týče koncentrace celkového cholesterolu, HDL-C, LDL-C, TAG, BMI, systolického a diastolického tlaku nebyly zjištěny žádné statistické rozdíly mezi oběma sledovanými skupinami. Mezi diabetiky a nediabetiky po zákroku na srdeční chlopni nebyly žádné statistické rozdíly mezi hodnotami hmotnostní koncentrace Lp-PLA2, což znamená, že se sledované výsledky mezi diabetiky a nediabetiky po proceduře nelišily.

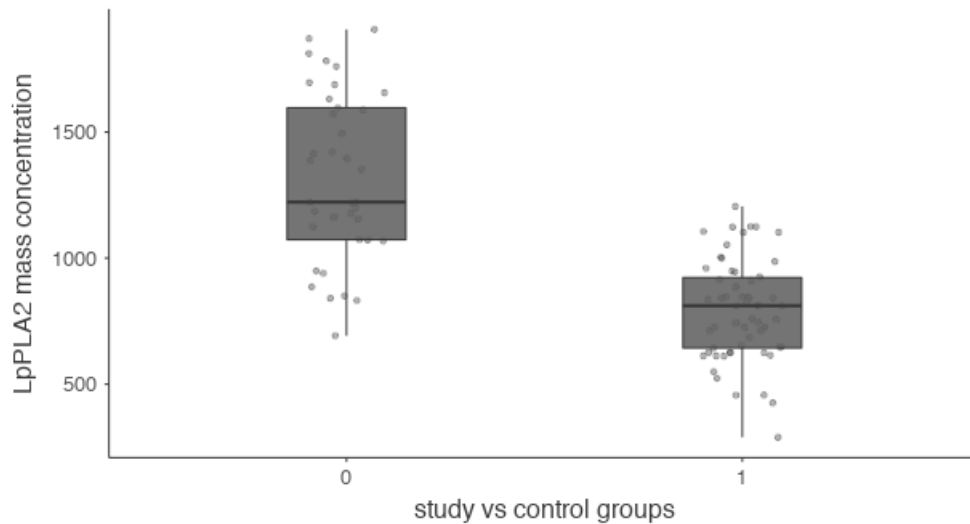
Dále se předpokládalo, že hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 roste po zákrocích na aortální chlopni – TAVI (provedené ať už přes apikální nebo transfemorální přístup) nebo BV. Použitím párového *t*-test jsme si tuto domněnku potvrdili; získali jsme statisticky významné odchylky  $p < 0.01$  u obou skupin: 1) u TAVI  $1296 \pm 358$  ng/ml před zákrokem a  $1604 \pm 437$  ng/ml po něm, a 2) u BV  $1413 \pm 268$  ng/ml před a  $1808 \pm 303$  ng/ml po proceduře. Tyto výsledky jsou ukázány ve schématu 10.



**Schéma 10 - Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace výrazně zvýšena po intervenci na srdeční chlopni**  
(výpočty zahrnují obě skupiny; jak diabetické, tak nediabetické pacienty)

Z výsledku nepárového *t*-testu jsme zaznamenali, že hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 před a po zákroku na aortální chlopni se výrazně nelišila, ať už bylo provedeno TAVI nebo BV. Získali jsme hodnotu  $p = 0,36$  při srovnání dvou skupin pacientů před příslušným zákrokem a  $p = 0,15$  po něm. Toto pozorování vedlo k závěru, že se hmotnostní koncentrace enzymu výrazně zvýšila ve stejné proporcii po manipulaci s aortální chlopni bez ohledu zvolenou léčebnou metodu (TAVI nebo BV).

A nakonec, do studie jsme zařadili kontrolní skupinu 48 zdravých geriatrických jedinců. To nám umožnilo lépe porozumět sledovaným změnám hmotnostní koncentrace Lp-PLA2. Užitím nepárového *t*-testu jsme došli k závěru, že hmotnostní koncentrace je významně zvýšena u studované populace ( $1319.77 \pm 341.82$  ng/ml) v porovnání s kontrolní skupinou ( $788.23 \pm 210.95$  ng/ml). Díky tomuto pozorování jsme získali hodnotu  $p < 0.01$ , jak je ukázáno ve schématu 11.



**Schéma 11 – Hmotnostní koncentrace LpPLA2 změřena ve studované populaci (0) a v kontrolní skupině (1) vykazující výrazný rozdíl**

## 11. Diskuze

V posledních letech byla Lp-PLA2 rozsáhle zkoumána jako nezávislý rizikový faktor KV chorob a jako aktivní účastník v procesu rozvoje aterosklerotického plátu. Data od více než 50 000 pacientů odhalila asociaci mezi zvýšenou Lp-PLA2 aktivitou či hmotnostní koncentrací a zvýšeným rizikem kardiovaskulární smrti, srdečního infarktu, akutního koronárního syndromu a ischemickou cévní mozkovou příhodou (Wilensky and Macphee, 2009). Toto je důležité zejména u posledního zmiňovaného, protože LDL a jiné lipidové faktory se neukázaly býti konzistentními prediktory CMP rizik (Gorelick, 2008).

Tato studie ukazuje, že Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace je zvýšená u starých pacientů v porovnání s mladší dospělou populací. Podle předchozích studií je normální rozmezí koncentrace pro Lp-PLA2 pro muže 120–342 ng/ml (90. percentil) (Colley, Wolfert and Cobble, 2011). V naší kontrolní skupině jsme změřili průměrnou hladinu koncentrace Lp-PLA2  $788.23 \pm 210.95$  ng/ml. Kontrolní skupina obsahovala 48 zdravých starých subjektů, kteří t.č. žili v domovech seniorů. Předpokládali jsme, že i tito senioři, kteří jsou považováni za zdravé, jsou ovlivněni subklinickou aterosklerózou. Zdůrazňujeme, že v reálné praxi je při studiu takto starých subjektů téměř nemožné najít zcela zdravé jedince. Proto takto označujeme plně soběstačné seniory bez omezení v mobilitě a bez kognitivních poruch.

Studovaná populace se skládala ze 44 starých pacientů, kteří podstoupili zákroky na aortální chlopni pomocí katétru. TAVI a BA jsou postupy vyhrazené pro pacienty se závažnou aortální stenózou. Lze tedy předpokládat, že zdravotní stav sledované populace je ovlivněn generalizovanou aterosklerózou. To by mohlo vysvětlit zvýšené hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 ( $1319,77 \pm 341,82$  ng/ml) měřené ve studované populaci před jakýmkoli zásahem nebo rozdělením do podskupin. Patofyziologické procesy vedoucí k degeneraci kalcifikované aortální chlopně jsou společné pro aterosklerózu a představují aktivní, proliferativní a zánětlivý proces způsobený poškozením endotelu v důsledku mechanického stresu a pronikání lipidů, což následně vede ke ztlušťování a kalcifikaci plátů.

Hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 změřené před jakýmkoli zásahem byly porovnány s běžnějšími markery metabolismu lipidů. Zjistili jsme silnou korelaci s LDL-C. To lze snadno vysvětlit skutečností, že částice LDL jsou hlavním nosičem Lp-PLA2; koncentrace tohoto enzymu se tedy musí zvyšovat nebo snižovat ve stejných proporcích.

Vztah mezi hmotnostní koncentrací Lp-PLA2 s LDL, HDL a celkovým cholesterolem byl prokázán v několika studiích (Tselepis a Chapman, 2002; Ballantyne, Hoogeveen a Bang, 2004; Iribarren, Gross, Darbinian, Jacobs, et al., 2005; Dohi a kol., 2011; Epps a Wilensky, 2011). Naše výsledky jsou v souladu s těmito předchozími studiemi. Důvodem, proč se Lp-PLA2 přednostně váže na malé husté a elektronegativnější LDL, je změna konformace apoB100 v těchto částicích. Kromě toho se předpokládá, že přítomnost oxidovaných fosfolipidů v LDL reguluje aktivitu Lp-PLA2.

Nenalezli jsme korelaci mezi Lp-PLA2 a HDL-C. Stále existují spory o tom, zda má Lp-PLA2 pro- nebo antiaterogenní vlastnosti. Tento spor vychází z poznatků o rozdílné vazebné preferenci Lp-PLA2 u myší (a jiných zvířat) a lidí. První studie z roku 2007, která proběhla na myších, krysách a morčatech prokazovala ochranný efekt Lp-PLA2. Tyto zvířecí druhy vykazují nižší koncentraci LDL a Lp-PLA2 je přenášena výhradně HDL, který zprostředkovává antiaterogenní funkce, jako je například inhibice infiltrace subendoteliálního prostoru makrofágy (Theilmeier et al., 2000). Předpokládáme, že důvod, proč jsme nenašli korelaci mezi Lp-PLA2 a HDL-C, je charakter studované populace. Jak již bylo výše zmíněno, je to vysoce riziková skupina se závažnou aortální stenózou a generalizovanou aterosklerózou. Zajímavostí je, že glykosylace plazmatické Lp-PLA2 na N-pozici brání vazbě enzymu na HDL (Tselepis et al., 2001). Po odstranění této glykosylace se zvyšuje vazba na HDL. Do budoucna by se tento fakt mohl stát předmětem zkoumání v rámci vývoje nových léčiv.

Další měření hmotnostní koncentrace Lp-PLA2 proběhlo 3 dny po kardiologických zákrocích. Výsledky ukázaly výrazný nárůst enzymové koncentrace. Protože patofyziologické procesy kalcifikace aortální chlopně a aterosklerózy jsou stejné, očekávali jsme vyšší hladiny sledovaného enzymu v nemocné chlopni (jako analogii aterosklerotického plátu). Zda-li je vyšší hladina koncentrace Lp-PLA2 po TAVI nebo BA přímým následkem mechanické manipulace chlopní během zákroku nebo jiného neznámého procesu, je pouze čistá spekulace, protože tento biomarker nebyl nikdy u pacientů po zákroku na aortální chlopni testován. Dopad těchto výsledků není znám, ale odběr tohoto markeru by mohl být zvážen v dalším follow-up těchto vysoce rizikových pacientů.

Nakonec jsme pacienty ve studii rozdělili na diabetiky a nediabetiky bez ohledu na typ jejich léčby. 42 % diabetických pacientů bylo na dietě, 14 % na p.o. antidiabetické léčbě a 42 % na terapii inzulinem. Naše studie ukázala výrazně zvýšené hladiny Lp-PLA2



u diabetických pacientů v porovnání s nediabetiky (před i po intervenci). Toto pozorování bylo prezentováno i v jiných studiích (Noto, Chitkara and Raskin, 2006; Corsetti et al., 2007). Mezi jednotlivými skupinami jsme nezaznamenali rozdíly v lipidogramu, zřejmě pro vysoký podíl pacientů užívajících statiny v obou skupinách. Z diabetiků, kteří toho času byli přijati k zákroku na aortální chlopni, bylo 62 % léčeno statinem. Bylo prokázáno, že u pacientů s diabetem statiny redukuje aktivitu Lp-PLA2 (Winkler et al., 2004).

Jak už bylo popsáno výše, u diabetiků vidáme typické změny v lipidogramu (často nazývané též jako diabetická dyslipidémie) - snížené hladiny HDL-C, zvýšené hladiny triacylglycerolů a u LDL dochází také ke kvalitativním změnám; molekuly jsou menší a denznější. Tyto částice jsou pak v extravaskulárním prostoru snadno absorbovány makrofágy. Celý proces pak přispívá k rozvoji aterosklerózy. Lp-PLA2 se preferenčně váže právě na malé, denzní a elektronegativní LDL částice. Tento fakt by mohl u diabetiků vysvětlovat abnormální distribuci Lp-PLA2 s relativně nízkou frakcí vazby na HDL (Kujiraoka et al., 2006). Zlepšení kontroly glykémie může redukovat aktivitu Lp-PLA2, zejména zvýšením relativního podílu Lp-PLA2 vázané na HDL, o kterém se předpokládá, že je ateroprotektivní (Sánchez-Quesada et al., 2012). Odhaduje se, že množství Lp-PLA2 vázané na malé, husté nebo elektronegativní LDL je 5 až 10krát vyšší než u normálních nebo elektro pozitivních částicích LDL (Benítez et al., 2003; Gazi et al., 2005). Množství lysofosfatidylcholinu v cirkulujícím LDL se u diabetických pacientů také zvyšuje (Sonoki et al., 2009). To může souviset se zvýšenou aktivitou Lp-PLA2. Prospektivní studie ukázala, že vyšší hladiny aktivity Lp-PLA2 byly u diabetiků spojeny se zvýšeným rizikem výskytu koronárních chorob (Hatoum et al., 2010). Nicméně nebylo provedeno srovnání mezi diabetiky a nediabetiky.

Navzdory grafickému trendu směrem k vyšší koncentraci TAG u diabetiků ve srovnání s nediabetickými pacienty, nebylo dosaženo významného statistického rozdílu. Nicméně jsme našli silnou statistickou korelaci mezi hmotnostní koncentrací Lp-PLA2 a koncentracemi TAG. Ve stavu inzulínové rezistence není inzulín schopný inhibovat hormon sensitive lipázu, což vede k mobilizaci volných mastných kyselin z tukové tkáně. To může narušit aktivitu lipoproteinové lipázy a vede ke snížení katabolismu apoB lipoproteinů bohatého na triglyceridy, způsobující nadprodukcí VLDL. Nízké koncentrace Lp-PLA2 se mohou vázat na VLDL (Srinivasan a Bahnson, 2010), tedy na hlavního nosiče TAG do tkání. Toto může vysvětlovat pozitivní korelaci mezi hmotností koncentrací Lp-PLA2 a koncentracemi TAG, kterou jsme v této studii vypožorovali.

Je nutné podotknout, že zvýšené hladiny LDL-C, TAG a nízké hladiny HDL-C jsou silně asociovány se zvýšeným rizikem vzniku makrovaskulárních (např. infarkt myokardu, ischemická mrtvice a koronární mortalita) i mikrovaskulárních komplikací (retinopatie, neuropatie a nefropatie) u pacientů s DM2T (Toth et al., 2012).

V porovnání s ostatními studiemi jsou hladiny změřené koncentrace Lp-PLA2 u studované populace extrémně zvýšené. V úvaze o možných příčinách nemůžeme zapomenout i na pre-analytické a analytické chyby. Teplota vzorků může spouštět biochemické spojování a rozpojování vazeb Lp-PLA2 na vazebné molekuly např. LDL. Kvůli těmto procesům je doporučeno vzorky okamžitě separovat a zmrazit na -70 °C na minimálně 18–24 hodin před samotnou analýzou. Před testem by pak měly být rozmrazeny na 4 °C. (Oliver et al., 2011). V naší studii byly krevní vzorky odebrány od pacientů do zkumavek s aktivátorem srážení a okamžitě po dopravení do příslušné nemocniční laboratoře centrifugovány. Sérum bylo odstředěno a uchováváno v -80°C. Kvůli logistickým a finančním problémům byly vzorky rozmrazeny na 4 °C a vyšetřeny pomocí ELISA metody ve chvíli, kdy byl nashromážděn dostatečný počet odebraných vzorků. Ačkoli se jedná o standartní postup naší a většiny ostatních laboratoří, nejsme schopni dokázat, zda tento postup neovlivnil naše výsledky.

Stejná metodologie byla použita k měření Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace v kontrolní skupině. Tím se snížil i případný pre-analytický problém popsany v předchozím odstavci.

Další možné vysvětlení těchto výsledků je spojeno s použitím lithium-heparin zkumavek. Tento typ konzervačního činidla může ovlivňovat výsledky Lp-PLA2 koncentrace směrem k vyšším hodnotám naměřených ELISA metodou. Kromě toho, výsledky komerčně dostupných testů pro měření koncentrace Lp-PLA2, tzv. PLAC testy, nejsou často pro statistické účely dostatečně reprodukovatelné. Bylo tedy navrženo, že by měření aktivity Lp-PLA2 mohlo sloužit spíše jako reprezentativní marker enzymové funkce.

Z prostudované literatury stojí za zmínku i některé postuláty. Rozsáhlé dostupné studie se pokusily najít vztah mezi hmotnostní koncentrací, aktivitou Lp-PLA2 a kardiovaskulárními příhodami. To znamená, že většina z nich jsou epidemiologické studie. U většiny byla zjištěna pozitivní korelace, avšak ne u všech. Jak již bylo zmíněno dříve, oxidace LDL částic je jedním z prvních kroků v patogenezi aterosklerózy. S nárůstem oxidovaného LDL se aktivizuje vrozený imunitní systém a zahajuje mobilizaci

monocytů a makrofágů k arteriální stěně. V této fázi exponenciálně stoupá množství Lp-PLA2 a zacílí na glycerofosfolipidy obsahující krátké a / nebo oxidované funkční skupiny na *sn*-2 pozici za vzniku lysofosfatidylcholinu a NEFA, u kterých byly hlášeny prozánětlivé a prooxidační vlastnosti. Hypotéza, podle které Lp-PLA2 aktivně přispívá k zánětu během aterosklerózy, vedla k vývoji reverzibilních inhibitorů. Z nich byl rozsáhle testován darapladib, nicméně nedokázal snížit výskyt kardiovaskulární smrti, infarktu myokardu, cévní mozkové příhody nebo celkovou mortalitu u pacientů se stabilními KV chorobami. Nesnížil ani výskyt velkých koronárních příhod po akutním koronárním syndromu. Tato zjištění vyvolávají otázku, zda zvýšené hladiny enzymu vůbec reflektují odpověď na prozánětlivý/prooxidační stres, který je pro aterosklerózu typický (Stafforini a Zimmerman, 2014).

Dále, silná pozitivní korelace Lp-PLA2 s LDL-C ukazuje, že zvýšené cirkulující hladiny Lp-PLA2 jsou spojeny s aterosklerózou, nicméně tato pozorování neprokazují příčinnou roli Lp-PLA2 v procesu onemocnění.

Další klíčovou nezodpovězenou otázkou je, zda činnost Lp-PLA2 probíhá v oběhu, v aterosklerotických plátech (a jiných tkáních) nebo v obou zároveň. Před hydrolýzou může být vyžadován transport do intracelulárního prostoru, přičemž vztah mezi cirkulující, tkáňovou Lp-PLA2 a oxidovanými fosfolipidy prozatím nebyl dostatečně kriticky zhodnocen.

## 12. Závěr

Na základě výsledků této studie uvedených výše, můžeme usuzovat následující závěry:

1. Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace je zvýšená u starých zdravých subjektů žijících v DD v porovnání s přijatým referenčním rozmezím pro dospělou populaci.
2. Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace je zvýšená u starých pacientů se stenózou aortální chlopně před TAVI nebo BV. Naměřené hodnoty studované populace jsou téměř 2x vyšší, než hodnoty kontrolní skupiny.
3. Byla zde silná korelace mezi Lp-PLA2 hmotnostní koncentrací a LDL-C, celkovým cholesterolem a TAG.
4. Po TAVI a BA nastalo statisticky významné zvýšení koncentrace Lp-PLA2.
5. U diabetiků je přítomna vyšší základní hladina Lp-PLA2 koncentrace ve srovnání s nediabetiky.
6. Lp-PLA2 hmotnostní koncentrace se zvýšila ve stejné míře u diabetiků i nediabetiků po TAVI nebo BA.

Studie byla podporována projekty IGA MH CR no. NT/12287-5, and PRVOUK P37/12.

## 13. Reference

Adiels, M. *et al.* (2005) 'Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(8), pp. 1697–1703. doi: 10.1161/01.ATV.0000172689.53992.25.

Arca, M., Pigna, G. and Favoccia, C. (2012) 'Mechanisms of Diabetic Dyslipidemia: Relevance for Atherogenesis', *Current Vascular Pharmacology*, 10(6), pp. 684–686. doi: 10.2174/157016112803520864.

Ballantyne, C., Hoogeveen, R. and Bang, H. (2004) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study', *ACC Current Journal Review*, 13(5), p. 26. doi: 10.1016/j.accreview.2004.04.046.

Ballantyne, C. M. *et al.* (2004) 'Clinical Investigation and Reports C-Reactive Protein, and Risk for Incident Coronary Heart Disease in Middle-Aged Men and Women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study', *Circulation*, 109, pp. 837–842. doi: 10.1161/01.CIR.0000116763.91992.F1.

Baumgartner, H. *et al.* (2017) '2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease The Task Force for the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Document Review', *European Heart Journal*, 38, pp. 2739–2791. doi: 10.1093/eurheartj/ehx391.

Ben-Dor, I. *et al.* (2013) 'Balloon aortic valvuloplasty for severe aortic stenosis as a bridge to transcatheter/surgical aortic valve replacement', *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 82(4), pp. 632–637. doi: 10.1002/ccd.24682.

Benítez, S. *et al.* (2003) 'Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Is Mainly Associated With Electronegative Low-Density Lipoprotein Subfraction', *Circulation*, 108, pp. 92–96. doi: 10.1161/01.CIR.0000072791.40232.8F.

Bentzon, J. F. *et al.* (2014) 'Mechanisms of Plaque Formation and Rupture', *Circulation Research*, 114(12), pp. 1852–66. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.

Blackie, J. A. *et al.* (2003) 'The Identification of Clinical Candidate SB-480848 : A Potent Inhibitor of Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13, pp. 1067–1070. doi: 10.1016/S0960-894X(03)00058-1.

Blake, G. J. *et al.* (2001) 'A Prospective Evaluation of Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Levels and the Risk of Future Cardiovascular Events in Women', *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier Masson SAS, 38(5), pp. 1302–1306. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01554-6.

Blankenberg, S. *et al.* (2003) 'Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease : results of a cross-sectional analysis', *Journal of Lipid Research*, 44, pp. 1381–1386. doi: 10.1194/jlr.M300086-JLR200.

Brilakis, E. S. *et al.* (2005) 'Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors , angiographic coronary artery disease , and major adverse events at follow-up', *European heart journal*, 26(2), pp. 137–144. doi: 10.1093/eurheartj/ehi010.

Camaré, C. *et al.* (2017) 'Angiogenesis in the atherosclerotic plaque', *Redox Biology*, 12, pp. 18–34. doi: 10.1016/j.redox.2017.01.007.

Cannon, C. P. *et al.* (2004) 'Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes', *New England Journal of Medicine*, pp. 1495–1504. doi: 10.1056/NEJMoa040583.

Cao, J. *et al.* (2011) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Interacts with Phospholipid Vesicles Via a Surface-Disposed Hydrophobic  $\alpha$ -Helix', *Biochemistry*, 50(23), pp. 5314–5321. doi: 10.1021/bi101916w.

Caslake, M. J. *et al.* (2010) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2, inflammatory biomarkers, and risk of cardiovascular disease in the Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER )', *Atherosclerosis*. Elsevier Ireland Ltd, 210, pp. 28–34. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.041.

Cho, E. *et al.* (2002) 'The impact of diabetes mellitus and prior myocardial infarction on mortality from all causes and from coronary heart disease in men', *Journal of the American College of Cardiology*, 40(5), pp. 954–960. doi: 10.1016/S0735-1097(02)02044-2.

Colley, K. J., Wolfert, R. L. and Cobble, M. E. (2011) 'Lipoprotein associated phospholipase A 2 : role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk'. doi: 10.1007/s13167-011-0063-4.

Corsetti, J. P. *et al.* (2006) 'High Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Is a Risk Factor for Recurrent Coronary Events in Postinfarction Patients', *Clinical Chemistry*, 52, pp. 1331–1338. doi: 10.1373/clinchem.2006.066845.

Corsetti, J. P. *et al.* (2007) 'Glycoprotein Ib Polymorphism T145M, Elevated Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 , and Hypertriglyceridemia Predict Risk for Recurrent Coronary Events in Diabetic Postinfarction Patients', *Diabetes*, 56, pp. 1429–1435. doi: 10.2337/db06-1573.

Daniels, L. B. *et al.* (2008) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A Is an Independent Predictor of Incident Coronary Heart Disease in an Apparently Healthy Older Population: The Rancho Bernardo Study', *Journal of the American College of Cardiology*, 51(9), pp. 913–919. doi: 10.1016/j.jacc.2007.10.048.

Dohi, T. *et al.* (2011) 'Decreased circulating lipoprotein-associated phospholipase A2 levels are associated with coronary plaque regression in patients with acute coronary syndrome', *Atherosclerosis*, 219(2), pp. 907–912. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.019.

Dong, Q. *et al.* (2010) 'Oncogenic action of phospholipase A 2 in prostate cancer', *Cancer Letters*, 240(1), pp. 9–16. doi: 10.1016/j.canlet.2005.08.012.

Donoghue, M. L. O. *et al.* (2015) 'Effect of Darapladib on Major Coronary Events After an Acute Coronary Syndrome The SOLID-TIMI 52 Randomized Clinical Trial', *JAMA*, 312(10), pp. 1006–1015. doi: 10.1001/jama.2014.11061.

Donoghue, M. O. *et al.* (2006) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 and Its Association With Cardiovascular Outcomes in Patients With Acute Coronary Syndromes in the PROVE IT-TIMI 22 ( PRavastatin Or atorVastatin Evaluation and Infection Therapy – Thrombolysis In Myocardial Infarct', *Circulation*, 113, pp. 1745–1752. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.612630.

Elkind, M. S. V *et al.* (2009) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity and Risk of Recurrent Stroke', *Cerebrovascular Diseases*, 27, pp. 42–50. doi: 10.1159/000172633.

Epps, K. C. and Wilensky, R. L. (2011) 'Lp-PLA2- a novel risk factor for high-risk coronary and carotid artery disease', *Journal of Internal Medicine*, 269(1), pp. 94–106. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02297.x.

Falk, E. *et al.* (2013) 'Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view', *European Heart Journal*, 34, pp. 719–728. doi: 10.1093/eurheartj/ehs411.

Finn, A. V *et al.* (2012) 'Hemoglobin Directs Macrophage Differentiation and Prevents Foam Cell Formation in Human Atherosclerotic Plaques', *Journal of the American College of Cardiology*, 59, pp. 166–77. doi: 10.1016/j.jacc.2011.10.852.

Garg, P. K. *et al.* (2015) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Risk of Incident Cardiovascular Disease in a Multi-Ethnic Cohort: The Multi Ethnic Study of Atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 241(1), pp. 176–182. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.006.

Gargiulo, G. *et al.* (2016) 'Transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement: A Systematic review and meta-analysis', *Annals of Internal Medicine*, 165(5), pp. 334–344. doi: 10.7326/M16-0060.

Gazi, I. *et al.* (2005) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Activity Is a Marker of Small, Dense LDL Particles in Human Plasma'. doi: 10.1373/clinchem.2005.058404.

Gorelick, P. B. (2008) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Risk of Stroke', *American Journal of Cardiology*, 101(12 SUPPL.). doi: 10.1016/j.amjcard.2008.04.017.

Grallert, H. *et al.* (2012) 'Eight genetic loci associated with variation in lipoprotein-associated phospholipase A2 mass and activity and coronary heart disease : meta-analysis of genome-wide association studies from five community-based studies', *European heart journal*, 33, pp. 238–251. doi: 10.1093/eurheartj/ehr372.

Hakkinen, T. *et al.* (1999) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase , Is Expressed by Macrophages in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions', *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 19, pp. 2909–2917. doi: 10.1161/01.ATV.19.12.2909.

Harvey D. White *et al.* (2014) 'Darapladib for Preventing Ischemic Events in Stable Coronary Heart Disease', *The New England Journal of Medicine*, 370(18), pp. 1702–11. doi: 10.1056/NEJMoa1315878.

Hatoum, I. J. *et al.* (2010) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Activity and Incident Coronary Heart Disease Among Men and Women With Type 2 Diabetes', *Diabetes*, 59, pp. 1239–1243. doi: 10.2337/db09-0730.

Hoffmann, M. M. *et al.* (2009) 'Genetic variants and haplotypes of lipoprotein associated phospholipase A2 and their influence on cardiovascular disease (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study)', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), pp. 41–48. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03216.x.

Hu, G. *et al.* (2019) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity and Mass as Independent Risk Factor of Stroke: A Meta-Analysis', *BioMed Research International*. Hindawi, 2019. doi: 10.1155/2019/8642784.

Iribarren, C., Gross, M. D., Darbinian, J. A., Jr, D. R. J., *et al.* (2005) 'Association of Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Mass and Activity With Calcified Coronary Plaque in Young Adults The CARDIA Study', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, pp. 216–221. doi: 10.1161/01.ATV.0000148322.89911.44.

Lung, B. and Vahanian, A. (2014) 'Epidemiology of acquired valvular heart disease', *Canadian Journal of Cardiology*. Elsevier Ltd, 30(9), pp. 962–970. doi: 10.1016/j.cjca.2014.03.022.

Jenny, N. S. *et al.* (2010) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) and Risk of Cardiovascular Disease in Older Adults: Results from the Cardiovascular Health Study', *Atherosclerosis*, 209(2), pp. 528–532. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.021.Lipoprotein-Associated.

Joseph, J. *et al.* (2017) 'Aortic Stenosis: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy', *American Journal of Medicine*. Elsevier Ltd, 130(3), pp. 253–263. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.10.005.

Katan, M. *et al.* (2014) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Is Associated with Atherosclerotic Stroke Risk: The Northern Manhattan Study', *PLoS ONE*, 9(1), p. e83393. doi: 10.1371/journal.pone.0083393.

Kiechl, S. *et al.* (2007) 'Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity, and 10-Year Cardiovascular Outcomes: Prospective Results From the Bruneck Study', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, pp. 1788–1795. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.145805.

Koenig, W. *et al.* (2004) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Adds to Risk Prediction of Incident Coronary Events by C-Reactive Protein in Apparently Healthy Middle-Aged Men From the', *Circulation*, 110, pp. 1903–1908. doi: 10.1161/01.CIR.0000143377.53389.C8.

Koenig, W. *et al.* (2006) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts future cardiovascular events in patients with coronary heart disease independently of traditional risk factors, markers of inflammation, renal function, and hemodynamic stress', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26, pp. 1586–1593. doi: 10.1161/01.ATV.0000222983.73369.c8.

Kolodgie, F. D. *et al.* (2006) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Protein Expression in the Natural Progression of Human Coronary Atherosclerosis', *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 26, pp. 2523–2529. doi: 10.1161/01.ATV.0000244681.72738.bc.

Kosaka, T. *et al.* (2001) 'Serum platelet-activating factor acetylhydrolase ž PAF-AH / activity in more than 3000 healthy Japanese', pp. 179–183.

Kujiraoka, T. *et al.* (2006) 'Altered distribution of plasma PAF-AH between HDLs and other lipoproteins in hyperlipidemia and diabetes mellitus', 44, pp. 2006–2014. doi: 10.1194/jlr.D300021-JLR200.

Li, D., Wei, W., *et al.* (2017) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risks of coronary heart disease and ischemic stroke in the general population : A systematic review and meta-analysis', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier, 471, pp. 38–45. doi: 10.1016/j.cca.2017.05.017.

Li, D., Zhao, L., *et al.* (2017) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 in coronary heart disease: Review and meta-analysis', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 465, pp. 22–29. doi: 10.1016/j.cca.2016.12.006.



Lin, J. *et al.* (2015) 'Association of Lp-PLA 2-A and early recurrence of vascular events after TIA and minor stroke', *Neurology*, 85, pp. 1585–1591. doi: 10.1212/WNL.0000000000001938.

Litvinov, D. *et al.* (2010) 'Anti-Atherosclerotic Actions of Azelaic acid, an End Product of Linoleic Acid Peroxidation, in Mice', *Atherosclerosis*, 209(2), pp. 449–454. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.076.Anti-Atherosclerotic.

Liu, P. Y. *et al.* (2006) 'Gene Polymorphism Is an Independent and Functional Risk Factor for Premature Myocardial Infarction', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4, pp. 1023–8.

Macphee, C. H., Nelson, J. and Zalewski, A. (2006) 'Role of lipoprotein-associated phospholipase A 2 in atherosclerosis and its potential as a therapeutic target', *Current Opinion in Pharmacology*, 6, pp. 154–161. doi: 10.1016/j.coph.2005.11.008.

Mallat, Z., Lambeau, G. and Tedgui, A. (2010) 'Lipoprotein-Associated and Secreted Phospholipases A 2 in Cardiovascular Disease Roles as Biological Effectors and Biomarkers', *Circulation*, (122), pp. 2183–2200. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.936393.

Mannheim, D. *et al.* (2008) 'Enhanced Expression of Lp-PLA2 and Lysophosphatidylcholine in Symptomatic Carotid Atherosclerotic Plaques', *Stroke*, 39(5), pp. 1448–1455. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.503193.Enhanced.

Muller, W. A. (2003) 'Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response', *TRENDS in Immunology*, 24(6), pp. 326–333. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00117-0.

Murakami, M. and Taketomi, Y. (2015) 'Secreted phospholipase A 2 and mast cells', *Allergology International*. Elsevier B.V, 64(1), pp. 4–10. doi: 10.1016/j.alit.2014.07.005.

Nevalainen, T. J., Graham, G. G. and Scott, K. F. (2008) 'Antibacterial actions of secreted phospholipases A 2 . Review', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.bbailip.2007.12.001.

Ninio, E. *et al.* (2004) 'Platelet-activating factor-acetylhydrolase and PAF-receptor gene haplotypes in relation to future cardiovascular event in patients with coronary artery disease', *Human Molecular Genetics*, 13(13), pp. 1341–1351. doi: 10.1093/hmg/ddh145.

Noto, H., Chitkara, P. and Raskin, P. (2006) 'The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in the metabolic syndrome and diabetes', *Journal of Diabetes and its Complications*, 20(6), pp. 343–348. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2006.07.004.

Oei, H. S. *et al.* (2005) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Is Associated With Risk of Coronary Heart Disease and Ischemic Stroke, The Rotterdam Study', *Circulation*, 111, pp. 570–575. doi: 10.1161/01.CIR.0000154553.12214.CD.

Oestvang, J. and Johansen, B. (2006) 'PhospholipaseA2: A key regulator of inflammatory signalling and a connector to fibrosis development in atherosclerosis', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, pp. 1309–1316. doi: 10.1016/j.bbailip.2006.06.003.

Oldgren, J. *et al.* (2007) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 does not predict mortality or new ischaemic events in acute coronary syndrome patients', *European heart journal*, 28, pp. 699–704. doi: 10.1093/eurheartj/ehl565.

Oliver, L. K. *et al.* (2011) 'Assessment of clinical performance without adequate analytical validation: A prescription for confusion', *Clinical Biochemistry*. The Canadian Society of Clinical Chemists, 44, pp. 1247–1252. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.07.005.

Packard, C. J. *et al.* (2000) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 as an Independent Predictor of Coronary Heart Disease', *The New England Journal of Medicine*, 343, pp. 1148–1155. doi: 10.1056/NEJM200010193431603.

Pant, S. *et al.* (2014) 'Inflammation and atherosclerosis - Revisited', *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 19(2), pp. 170–178. doi: 10.1177/1074248413504994.

Parish, S. *et al.* (2010) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and mass in relation to vascular disease and nonvascular mortality', *Journal of Internal Medicine*, 268, pp. 348–358. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02258.x.

Persson, M. *et al.* (2007) 'The epidemiology of Lp-PLA 2: Distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort', *Atherosclerosis*, 190, pp. 388–396. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.016.

Persson, M. *et al.* (2008) 'Lp-PLA2 activity and mass are associated with increased incidence of ischemic stroke .A population-based cohort study from Malmo, Sweden', *Atherosclerosis*, 200, pp. 191–198. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.001.

Persson, M., Hedblad, B. and Nelson, J. J. (2007) 'Elevated Lp-PLA 2 Levels Add Prognostic Information to the Metabolic Syndrome on Incidence of Cardiovascular Events Among Middle-Aged Nondiabetic Subjects', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, pp. 1411–1416. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.142679.

Pokharel, Y. *et al.* (2015) 'Lipoprotein associated Phospholipase A2 Activity and Apolipoprotein C3 Loss-of-function Variants and Cardiovascular Disease: The Atherosclerosis Risk In Communities Study', *Atherosclerosis*, 241(2), pp. 641–648. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.033.

Quillard, T. *et al.* (2017) 'Mechanisms of Erosion of Atherosclerotic Plaques', *Current Opinion in Lipidology*, 28(5), pp. 434–441. doi: 10.1097/MOL.0000000000000440.

Ramanadham, S. *et al.* (2015) 'Calcium independent phospholipases A2 and their biological processes and diseases', *Journal of Lipid Research*, 56, pp. 1643–1668. doi: 10.1194/jlr.R058701.

Reardon, M. J. *et al.* (2017) 'Surgical or transcatheter aortic-valve replacement in intermediate-risk patients', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 376(14), pp. 1321–1331. doi: 10.1056/NEJMoa1700456.

Ridker, P. M. *et al.* (2012) 'Relationship of Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Mass and Activity with Incident Vascular Events among Primary Prevention Patients Allocated to Placebo or to Statin Therapy: An Analysis from the JUPITER Trial METHODS ', *Clinical Chemistry*, 58(5), pp. 877–886. doi: 10.1373/clinchem.2011.180281.

Robins, S. J. *et al.* (2008) 'Cardiovascular Events With Increased Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Low High-Density Lipoprotein-Cholesterol', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, pp. 1172–1178. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.160739.

Sánchez-Quesada, J. L. *et al.* (2012) 'Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution', *American Journal of Cardiology*. Elsevier Inc., 110(1), pp. 67–71. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.02.051.

Santoso, A. *et al.* (2017) 'Associations between four types of single-nucleotide polymorphisms in PLA2G7 gene and clinical atherosclerosis: a meta-analysis', *American Journal of Cardiovascular Diseases*, 7(6), pp. 122–133.

Sato, H. *et al.* (2014) 'The Adipocyte-Inducible Secreted Phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E Play Distinct Roles in Obesity', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 20(1), pp. 119–132. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.002.

Schaar, J. A. *et al.* (2004) 'Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques Report of a Meeting on the Vulnerable Plaque', *European Heart Journal*, 25, pp. 1077–1082. doi: 10.1016/j.ehj.2004.01.002.

Serruys, P. W. *et al.* (2008) 'Effects of the Direct Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Inhibitor Darapladib on Human Coronary', *Vascular Medicine*, 118, pp. 1172–1182. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771899.

Sonoki, K. *et al.* (2009) 'Relations of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein with serum lipoprotein-associated phospholipase A2, paraoxonase and homocysteine thiolactonase activities in patients with type 2 diabetes mellitus', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 86(2), pp. 117–123. doi: 10.1016/j.diabres.2009.08.014.

Srinivasan, P. and Bahnson, B. J. (2010) 'Molecular Model of Plasma PAF Acetylhydrolase-Lipoprotein Association : Insights from the Structure', pp. 541–557. doi: 10.3390/ph3030541.

Stafforini, D. M. *et al.* (1999) 'Molecular Basis of the Interaction between Plasma Platelet- activating Factor Acetylhydrolase and Low Density Lipoprotein \*', 274(11), pp. 7018–7024.

Stafforini, D. M. (2009) 'Biology of Platelet-activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH, Lipoprotein Associated Phospholipase A2)', *Cardiovasc Drugs Ther*, 23, pp. 73–83. doi: 10.1007/s10557-008-6133-8.

Stafforini, D. M. and Zimmerman, G. A. (2014) 'Unraveling the PAF-AH/Lp-PLA2 controversy', *Journal of Lipid Research*, 55(9), pp. 1811–1814.

Stein, E. A. (2012) 'Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 Measurements: Mass, Activity, but Little Productivity', *Clinical Chemistry*, 58(5), pp. 814–817. doi: 10.1373/clinchem.2012.183475.

Suchindran, S. *et al.* (2010) 'Genome-Wide Association Study of Lp-PLA 2 Activity and Mass in the Framingham Heart Study', *PLoS Genetics*, 6(4), p. e10000928. doi: 10.1371/journal.pgen.1000928.

Sutton, B. S. *et al.* (2008) 'Comprehensive genetic analysis of the platelet activating factor acetylhydrolase (PLA2G7) gene and cardiovascular disease in case-control and family datasets', *Hum Mol Genet*, 17(9), pp. 1318–1328. doi: 10.1093/hmg/ddn020.

Theilmeyer, G. *et al.* (2000) 'HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE(-/-) mice', *FASEB Journal*, 14(13), pp. 2032–2039. doi: 10.1096/fj.99-1029com.

Thompson, A. *et al.* (2010) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: Collaborative analysis of 32 prospective studies', *The Lancet*, 375(9725), pp. 1536–1544. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60319-4.

Tian, Y. *et al.* (2017) 'The associations of stroke, transient ischemic attack, and/or stroke-related recurrent vascular events with Lipoprotein-associated phospholipase A2: A systematic review and meta-analysis', *Medicine*, 96(51), p. e9413. doi: 10.1097/MD.00000000000009413.

Toth, P. P. *et al.* (2012) *The impact of serum lipids on risk for microangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus*, *Cardiovascular Diabetology*. doi: 10.1186/1475-2840-11-109.

Tselepis, A. D. *et al.* (2001) 'N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL', 42.

Tselepis, A. D. and Chapman, M. J. (2002) 'Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: Potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase', *Atherosclerosis Supplements*, 3(4), pp. 57–68. doi: 10.1016/S1567-5688(02)00045-4.

Tsimikas, S. *et al.* (2009) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity , ferritin levels , metabolic syndrome , and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality : results from the Bruneck study', *European Heart Journal*, 30, pp. 107–115. doi: 10.1093/eurheartj/ehn502.

Virmani, R. *et al.* (2000) 'Lessons From Sudden Coronary Death', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(5), pp. 1262–1275. doi: 10.1161/01.atv.20.5.1262.

Webb, N. R. (2005) 'Secretory phospholipase A 2 enzymes in atherogenesis', *Current Opinion in Lipidology*, 16, pp. 341–344.

Wei, L. *et al.* (2017) 'The elevated lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with the occurrence and recurrence of acute cerebral infarction', *Clinical Neurosciences*, 28, pp. 325–330. doi: 10.1097/WNR.0000000000000765.

White, H. D. *et al.* (2013) 'Changes in lipoprotein-associated phospholipase A2 activity predict coronary events and partly account for the treatment effect of pravastatin: Results from the long-term intervention with pravastatin in ischemic disease study', *Journal of the American Heart Association*, 2(5), pp. 1–13. doi: 10.1161/JAHA.113.000360.

Wilensky, R. L. *et al.* (2008) 'Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development', *Nature Medicine*, 14(10), pp. 1059–1066. doi: 10.1038/nm.1870.Inhibition.

Wilensky, R. L. and Macphee, C. H. (2009) 'Lipoprotein-associated phospholipase A2 and atherosclerosis', *Current Opinion in Lipidology*, 20(5), pp. 415–420. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283307c16.

Winkler, K. *et al.* (2004) 'Fluvastatin Slow-Release Lowers Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase Activity: A Placebo-Controlled Trial in Patients with Type 2 Diabetes', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(3), pp. 1153–1159. doi: 10.1210/jc.2003-031494.

Wu, L. and Parhofer, K. G. (2014) 'Diabetic dyslipidemia', *Metabolism: Clinical and Experimental*. Elsevier Inc., 63(12), pp. 1469–1479. doi: 10.1016/j.metabol.2014.08.010.

Xia, W., Hu, Z. and Song, Z. (2017) 'Meta-analysis for the relationship between lipoprotein-associated phospholipase A2 and ischemic stroke', *J Cent South Univ (Med Sci)*, 42(2), pp. 208–214. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2017.02.015.

Yamada, Y. *et al.* (1998) 'Identification of the G994 → T missense mutation in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 47(2), pp. 177–181. doi: 10.1016/S0026-0495(98)90216-5.

Zalewski, A. and Macphee, C. (2005) 'Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A 2 in Atherosclerosis Biology, Epidemiology, and Possible Therapeutic Target', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, pp. 923–931. doi: 10.1161/01.ATV.0000160551.21962.a7.

## 14. Publikace autorů

### 14.1. Původní práce

1. Malaska J., Slezak M., Schwarz D., et al., "Léčba těžké sepse na pracovištích intenzivní péče v České republice – pilotní výsledky projektu EPOSS" *Vnitř Lék* 2013; 59(11): 962-970 (treatment of severe sepsis at the intensive care units of Czech Republic, pilot results from EPOSS Project)
2. **Fortunato J.**, Bláha V., Bis J., et al., "Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub> Mass Level Is Increased in Elderly Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2014, Article ID 278063, 6 pages, 2014. doi:10.1155/2014/278063, **IF 2,717**
3. Bláha V., Stasek J., Bis J., **Fortunato J.**, et al., "The Role of VEGF in the Diabetic Patients Undergoing Endovascular Therapy of Symptomatic Aortic Valve Stenosis", *Physiol. Res.* 2014; 63(3): 351:359, ISSN 0862-8408, **IF 1,487**

4. Bláha V., Stasek J., Bis J., **Fortunato J.**, et al, "Changes of serum fetuin-a in aged patients who undergone transcatheter aortic valve implantation or balloon angioplasty for the treatment of aortic stenosis", *Atherosclerosis* 2015;241(1):e211-e212. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.1003,
5. Skořepa P., Sobotka O., **Fortunato J.**, Bláha V., Horáček J. M., Ústřední role glukózy v metabolismu a výživě kriticky nemocných pacientů, *Mil. Med. Sci. Lett.*, 2017, vol. 86, no. 4, p. 145-157. ISSN 0372-7025
6. Vladimír Blaha, Dagmar Solichová, Milan Blaha, Miriam Lanska, Eduard Havel, Pavel Vyroubal, Lenka Kujovská Krcmová, Pavel Zak, Lubos Sobotka, **Joao Fortunato** (2017). Impact of lipoprotein apheresis on the content of alpha-tocopherol in cell membranes and lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 263. e244. 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.791.
7. **Fortunato J.**, Skořepa P., Fortunato M., Bláha V., Markery kardiovaskulárního rizika u geriatrických pacientů: zaměřeno na lipoprotein-asociovanou fosfolipázu A2, *Geriatric a gerontology* 2018;7(2):68-71, ISSN 1805-4684, článek v recenzovaném časopise
8. Skořepa P., Sobotka O., **Fortunato J.**, Bláha V., Horáček J.M., Ústřední role glukózy v metabolismu a výživě kriticky nemocných pacientů, The central role of glucose in metabolism and nutrition of critically ill patients. *Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy)* 2017, 86(1), 145-157 ISSN 0372-7025

## 14.2. Abstrakty

1. Skořepa P., Visek J., Blaha V., **Fortunato J.**, et al, "MON-PP010: Retrospective Study of Two Antiseptic Regimens for Catheter-Associated Bloodstream Infection (CBSI) Treatment in Home Parenteral Nutrition Patients", *Clinical Nutrition* 34(1):S130-131, doi: 10.1016/S0261-5614(15)30442-8. ISSN 0261-5614
2. **Fortunato J.**, Skořepa P., Blaha V., Sobotka L., Horacek J.M., Plasma NEFA concentrations in ICU patients are not related to the fat/glucose based parenteral nutrition regime. *Atherosclerosis*, 2017, vol. 263, p. e223, ISSN 0021-9150, **IF 4.239**

3. Skorepa P., **Fortunato J.**, Blaha V., Sobotka L., Horacek J.M. effect on the hepatic function and triglyceridemia. *Atherosclerosis*, 2017, vol. 263, p. e223-e224, ISSN 0021-9150, **IF 4.239**
4. **Fortunato J.**, Skorepa P., Blaha V., Horacek J.M., Plasma non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations may decrease with a glucose based parenteral nutrition regime. *Atherosclerosis*, 2018, vol. 275, p. e26. ISSN 0021-9150. **IF 4.467**
5. Skorepa P., **Fortunato J.**, Blaha V., Horacek J.M., Effects of isoenergetic isonitrogenous glucose-based or lipid-based total parenteral nutrition on concentration of non-esterified fatty acids in critically ill patients. 86. EAS Congress, Lisabon, Květen 2018
6. Skorepa P., **Fortunato J.**, Blaha V., Horacek J. M. Serum concentration of non-esterified fatty acids (NEFAS) in non-surgical critically ill patients: the impact of specific types of total parenteral nutrition (TPN). *Atherosclerosis*, 2018, vol. 275, p. e152-153. ISSN 0021-9150. **IF 4.467**
7. Sobotka O., **Fortunato J.**, Skorepa P., Blaha V., Havlova K., Lejskova L., Sobotka L. Effect of early glucose infusion on plasma mineral levels in very old patients. *Clinical Nutrition*, 2019;38(1)S1-S354. ISSN 0261-5614. **IF 6.402**

### 14.3. Postery

1. Skorepa P., Vísek J., Blaha V., **Fortunato J.**, Sobotka L. Retrospective study of two antiseptic regiment for catheter-associated bloodstream infection (CBSI) treatment in home parenteral nutrition patients. 37th. ESPEN Congress on clinical nutrition and metabolism, Lisbon, Portugal, 5 – 8. 9. 2015
2. **Fortunato J.**, Skorepa P., Blaha V., Sobotka L., Horacek J. M., Plasma NEFA concentrations in ICU patients are not related to the fat/glucose based parenteral nutrition regime. 85th EAS Congress, Praha, 23–26.4.2017.
3. Skorepa P., **Fortunato J.**, Blaha V., Sobotka L., Horacek J. M., Long-term high carbohydrate parenteral nutrition does not have negative effect on the hepatic function and triglyceridemia. 85th EAS Congress, Praha, 23–26.4.2017

4. **Fortunato J.**, Skorepa P., Blaha V., Horacek J.M., Plasma non-esterified fatty acids (NEFA) concentrations may decrease with a glucose-based parenteral nutrition regime. 86th EAS Congress, Lisbon 5.-8.5.2018
5. Skorepa P., **Fortunato J.**, Blaha V., Horacek J.M., Serum concentration of non-esterified fatty acids (NEFAs) in non-surgical critically ill patients: the impact of specific types of total parenteral nutrition (TPN), 86th EAS Congress, Lisbon 5.-8.5.2018
6. **Fortunato J.**, Skorepa, P., Bláha V., Horaček J. M., Plazmatická koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) se snižuje při podávání parenterální výživy bez tuků, *22. kongres o ateroskleróze*, Olomouc, 7. - 8. prosince 2018, poster na celostátní konferenci
7. Skorepa P., **Fortunato J.**, Bláha V., Horaček J. M., Vliv plné parenterální výživy na koncentrace NEFA u pacientů na JIP, *22. kongres o ateroskleróze*, Olomouc, 7. - 8. prosince 2018, poster na celostátní konferenci